

Nachweis der Expression und Funktionalität des ABC-Transporters P-Glycoprotein in der Bovine Caruncular Epithelial Cell Line 1(BCEC-1)

BERIT WATERKOTTE

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2010

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2010

© 2010 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

und

dem Zentrum für Frauenheilkunde & Geburtshilfe
des Universitätsklinikums Gießen und Marburg
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuerin: Prof. Dr. Christiane Pfarrer

**Nachweis der Expression und Funktionalität
des ABC-Transporters P-Glycoprotein
in der Bovine Caruncular Epithelial Cell Line 1
(BCEC-1)**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

BERIT WATERKOTTE

Tierärztin aus Hilden

Gießen 2010

Gefördert durch die H. Wilhelm Schaumann Stiftung

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter/in: Prof. Dr. C. Pfarrer
Prof. Dr. J. Geyer

Tag der Disputation: 28.06.2010

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen.....	3
1 Einleitung und Literaturübersicht	5
1.1 Bovine Plazenta	5
1.1.1 Bovine Plazenta – Einteilung und Besonderheiten.....	5
1.1.2 Das bovine Plazentom – Aufbau	7
1.1.3 Bovine Karunkel-Epithel-Zelllinie 1 (BCEC-1)	7
1.1.4 Veterinärmedizinische Bedeutung des Zellmodells BCEC-1	10
1.2 Transport.....	13
1.2.1 Membranständige Transportsysteme - Allgemeines	13
1.2.2 ABC-Transporter	14
1.3 MDR1 in der Plazenta	24
1.4 Zielsetzung der Arbeit	25
2 Material und Methoden.....	27
2.1 Zellkultur.....	27
2.1.1 Kultivierung im Transwell-System	29
2.2 mRNA-Nachweis mittels Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)	30
2.2.1 RNA-Extraktion aus Zellen und Gewebe.....	30
2.2.2 Konzentrationsbestimmung der RNA	32
2.2.3 Reverse Transkription	33
2.2.4 Polymerase-Ketten-Reaktion	35
2.2.5 Gelelektrophorese.....	37
2.2.6 Aufreinigung der DNA und Sequenzierung	37
2.3 Immunfluoreszenz-Untersuchung: Nachweis und Lokalisierung von P-Glycoprotein in BCEC-1	39
2.3.1 Protokoll für die Immunfluoreszenz	40
2.3.2 Verwendete Antikörper und Kontrollen.....	41
2.3.3 Auswertung und Dokumentation	42
2.4 Rhodamin-Assay: Analyse der Funktionalität von MDR-1 in BCEC-1 mittels FACS	42
2.4.1 Protokoll für den Rhodamin-Assay.....	44
2.4.2 Auswertung und Dokumentation	50

2.5	Transportassay: Analyse der Funktionalität von MDR-1 in BCEC-1 mittels ^3H -Digoxin	51
2.5.1	Protokoll für die Transportmessungen	51
2.5.2	Protokoll für die Blockierung des Digoxin-Transportes.....	53
2.5.3	In der Transportmessung eingesetzte Konzentrationen	55
2.5.4	Dokumentation und Auswertung	55
3	Ergebnisse	57
3.1	Ergebnisse der RT-PCR.....	57
3.2	Ergebnisse der Immunfluoreszenz	58
3.3	Ergebnisse des Rhodamin-Assays.....	60
3.4	Ergebnisse des Transport-Assays.....	62
3.4.1	TEER-Messungen.....	62
3.4.2	Digoxin-Transport.....	63
3.4.3	Blockierung des Digoxin-Transportes	65
4	Diskussion.....	67
4.1	Lokalisierung von P-Glycoprotein.....	67
4.2	Beteiligung der drei ABC-Transporter P-gp, MRP1 und BCRP am Rhodamin-Transport	68
4.3	Transport von radioaktiv markiertem Digoxin	71
4.4	BCEC-1 als in vitro Modell für plazentaren Transport	73
5	Zusammenfassung	77
6	Summary	79
7	Literaturverzeichnis.....	81
8	Anhang	93
8.1	Lösungen und Puffer	93
8.2	Material	98
8.3	Abbildungsverzeichnis.....	103
8.4	Tabellenverzeichnis.....	104
8.5	Abstracts und Präsentationen	105
8.6	Danksagung	106
8.7	Erklärung.....	108

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ABC	ATP-Binding-Cassette
Ak	Antikörper
α -sm Aktin	alpha smooth muscle Aktin
Aqua dest.	Aqua destillata, einfach destilliertes Wasser
ATP	Adenosin-Triphosphat
BCEC-1	Bovine Caruncular Epithelial Cell Line 1
BCRP	Breast Cancer Resistance Protein
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cp	zytopathogen
Da	Dalton
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxy-Ribonukleosidtriphosphat
dpm	disintegration per minute (Zerfall pro Minute)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FKS	Foetales Kälberserum
HCl	Salzsäure
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
LDL	Low Density Lipoprotein
M	molar
MDR	Multidrug-resistance
MDR1	Multidrug-resistance Protein 1 (P-Glycoprotein)
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure

MRP	Multidrug-resistance related protein
NaCl	Natriumchlorid
NBD	Nukleotid-Bindungsdomäne
NCBI	National Center for Biotechnological Information
ncp	nicht-zytopathogen
OATP	Organic Anion Transporting Polypeptides
p.c.	post conceptionem
Pen/Strep	Penicillin/ Streptomycin
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PGF _{2α}	Prostaglandin F 2 alpha
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
TAE	Tris-Azetat-EDTA-Puffer
Taq	Thermus aquaticus
TEER	Transepithelial electrical resistance
TGC	Trophoblast Giant Cells
TMD	Transmembran-Domäne
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units

1 Einleitung und Literaturübersicht

1.1 Bovine Plazenta

1.1.1 Bovine Plazenta – Einteilung und Besonderheiten

Für die Dauer der Trächtigkeit bilden fetales und maternales Gewebe in Form der Plazenta ein gemeinsames Organ. Während dieses Zeitraums dient sie dem Schutz des Embryos, dem Erhalt der Gravidität durch Hormonproduktion (Hoffmann & Schuler 2002) und dem physiologischen (Dantzer & Leiser 2006) und funktionellen Austausch zwischen Fetus und Mutter, um Wachstum und Differenzierung eines vitalen Neugeborenen zu gewährleisten (Mossman 1987). Nach Steven (zitiert in Wooding & Flint 1994) bildet sie hierfür eine Anordnung aus einem oder mehreren Transportepithelien zwischen fetalem und maternalem Kreislauf.

Die Einteilung und Zuordnung der Plazenta hat sich im Laufe der Jahre oft gewandelt und erweitert. Ihren Anfang hat diese Entwicklung durch Strahl (1906) und Grosser (1909; 1927) genommen, die klinische, mikroskopische und makroskopische Kriterien für die Kategorisierung herangezogen haben.

So gruppiert man die Plazenta nach folgenden Gesichtspunkten: dem Abgang der Eihäute bei der Geburt, der Form der fetomaternalen Verbindung und der Verteilung dieser Kontaktstellen, dem histologischen Erhalt und der Differenzierung der geweblichen Schichten von Mutter und Fetus während der Gravidität.

Das Rind weist eine Plazenta des adeciduaten Typs auf. Hier lösen sich maternale und fetale Gewebe bei der Geburt ohne bedeutende Gewebeschädigung voneinander ab (Grosser 1927). Spezies, die eine deciduate Plazenta haben, wie z.B. Hund und Katze, erleiden bei der Geburt aufgrund eines teilweisen Abbaus maternalen Gewebes einen etwas größeren Gewebe- und Blutverlust als adeciduate Spezies. Daher muss ihre Uterusmukosa während des Puerperiums regenerieren.

Form und Verteilung der fetomaternalen Kontaktstellen des Rindes bedingen eine Klassifizierung als Plazenta multiplex sive cotyledonaria (Strahl 1906). Bei dieser Form weist das Chorion zahlreiche begrenzte Zottenfelder (Kotyledonen) auf, welche Verbindung zu den präformierten, heute Uteruskrypten genannten, uterinen Gruben und Grübchen der Karunkeln aufnehmen. Auf diese Weise werden Plazentome geformt (Dantzer & Leiser 2006). Im interkarunkulären Bereich der Plazenta lagert sich das Chorion locker an das maternale Epithel an.

Teilt man die Plazenta nach histologischen Merkmalen ein, nämlich auf Basis der interhämalen Strukturen, so wird die Plazenta des Rindes zunächst als Placenta epitheliochorialis bezeichnet (Grosser 1909; Mossman 1987). Hier besteht die Plazentarschranke, also die den fetalen und maternalen Blutkreislauf voneinander trennenden Schichten, aus dem Endothel der maternalen Blutgefäße, fetalwärts gefolgt von maternalem (uterinem) Epithel, welches über Mikrovilli mit dem fetalen Epithel (Chorion, Trophoblast) verbunden ist und schließlich aus dem fetalen Gefäßendothel. Die Blutgefäße sind auf maternaler Seite in das bindegewebige Stroma und fetalseits in das fetale Mesenchym eingebettet.

Bei einer epitheliochorialen Plazenta bleibt nicht nur das Epithel der maternalen Seite, (Björkman & Bloom 1957) sondern konsequenterweise auch das Endothel intakt. Abzugrenzen ist dieses zum einen von endotheliochorialen Plazenten mit direktem Kontakt des Chorions zum maternalen Gefäßendothel wie bei Hund und Katze, und zum anderen von der Placenta haemochorialis. Letztere zeichnet sich durch eine Zerstörung des maternalen Epithels und Endothels aus, so dass das fetale Epithel direkt an das maternale Blut grenzt. Vertreten ist die haemochoriale Plazenta z.B. bei Nagern und Kaninchen.

Die bovine Plazenta weist eine zusätzliche Besonderheit innerhalb der Gruppe der epitheliochorialen Plazenten auf. Neben uninukleären Trophoblastzellen, finden sich bei ihr auch nicht-polarisierte, durch azytokinetische Mitose entstandene binukleäre Trophoblastzellen (Wimsatt 1951; Björkman 1954; Klisch et al. 1999). Diese werden als Trophoblastriesenzellen (Trophoblast Giant Cells, TGC) bezeichnet (Klisch et al. 1999). Sie migrieren in das maternale Epithel (Wooding 1982) und werden durch Fusion mit Zellen dieser Schicht zu trinukleären feto-maternalen Hybridzellen. Die Hybridzellen stellen Synzytien dar, welche hormonell aktive Produkte wie Progesteron und plazentares Laktogen an die mütterliche Seite abgeben (Reimers et al. 1985; Wooding 1992; Zoli et al. 1992), um danach zu Grunde zu gehen (Wooding et al. 1982) und vom Trophoblasten resorbiert zu werden (Klisch et al. 1999; Schuler et al. 2000).

Der Vorgang der Migration und Fusion wird als "eingeschränkte Trophoblastinvasion" bezeichnet (Pfarrer et al. 2003) und bedingt eine zusätzliche Eingruppierung der bovinen Plazenta in die Gruppe der synepitheliochorialen feto-maternalen Verbindungen (Wooding 1992).

1.1.2 Das bovine Plazentom – Aufbau

Die pilzförmigen Plazentome, von denen sich 70 bis 150 in zwei mesometrialen und zwei antimesometrialen Längsreihen anordnen, setzen sich aus mütterlicher Karunkel und fetaler Kotyledone zusammen. Die Karunkel weist einen Stiel und davon ausgehende bindegewebige Haupt-, Intermediär- und Terminalsepten auf. Zwischen diesen liegen die entsprechenden Krypten, welche mit einschichtigem Epithel ausgekleidet sind. In die Krypten schieben sich, im Zuge der Implantation, die Zotten der aus dem Chorion entstehenden Kotyledone komplementär hinein (Björkman 1954; Leiser 1975). Diese Zotten verzweigen sich im Verlauf der Trächtigkeit, so dass ein Chorionzottenbaum mit Primär-, Sekundär- und Tertiärzotten entsteht (Pfarrer et al. 2001).

An den Kontaktflächen verzahnen sich Mikrovilli von Trophoblast und Uterusepithel miteinander (Björkman & Bloom 1957; Leiser 1975; Leiser & Kaufmann 1994). Dieses dient der Verankerung der beiden Kompartimente einerseits und einer Vergrößerung der Austauschoberfläche andererseits. Nicht beteiligt an dieser Verzahnung sind die TGC (Leiser 1975).

In den Zotten und Septen verlaufende Venen und Arterien (Leiser et al. 1997; Pfarrer et al. 2001) gewährleisten den Austausch nutritiver Stoffe und letztlich auch anderer, extrinsischer Substanzen. Hier spricht man von hämotropher Nährstoffversorgung des Fetus. Demgegenüber erfolgt eine histiotrophe Versorgung über Sekrete der uterinen Drüsen in den interkarunkulären Regionen (Grosser 1927).

Zwar erlangen die Plazentome während der ersten Gestationshälfte (zwischen Tag 80 und 95) bereits ihre grundsätzliche Struktur (Björkman 1954), doch wird diese im Verlauf der Gestation zunehmend komplexer (Leiser et al. 1997; Leiser et al. 1998) und die Plazentome werden größer (Björkman 1954).

1.1.3 Bovine Karunkel-Epithel-Zelllinie 1 (BCEC-1)

Die detaillierte Untersuchung trächtigkeitsspezifischer Vorgänge in der (syn)epitheliochorialen Plazenta des Rindes bedarf eines in vitro Modells, welches es 1. erlaubt potentiell regulative Faktoren in einem überschaubaren Rahmen zu studieren und 2. repräsentativ für die beteiligten Zellen ist. Nur anhand eines adäquaten Zellmodells lassen sich molekulare Ausstattungen und Mechanismen, wie die Beteiligung bestimmter Transportmechanismen am fetomaternalen Austausch oder Zusammenhänge intrauteriner fetaler Infektionen, klären.

In der Vergangenheit wurden für Studien zum maternalen Kompartiment vor allen Dingen endometriale Zellen nicht gravidier Tiere (Fortier et al. 1988; Munson et al. 1988; Asselin et al. 1998; Xiao & Goff 1998) verwendet. Ein weiterer Ansatz war die Nutzung epithelialer Zellen, gewonnen aus der Karunkel-Anlage eines Fetus (Munson et al. 1988). Diese Zellen konnten für die Dauer von 10 Passagen genutzt werden.

Viele der Studien unterschieden jedoch nicht zwischen den Regionen der Zellgewinnung oder zwischen den Zellarten. Welche Bedeutung aber die Wahl der Zellen für Untersuchungen haben kann, konnten Asselin et al. (1998) in einer vergleichenden Studie zur Wirkung von Oxytocin und Interferon-Tau auf endometriale Zellen der Karunkel-Anlage und Zellen der interkarunkulären Regionen zeigen. So ergab sich, dass Oxytocin die $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Produktion der Karunkel-Region deutlich weniger anregt als die der interkarunkulären Gebiete.

Nur wenige Arbeiten befassten sich mit maternalen Zellen trächtiger Tiere (Shemesh et al. 1984; Shemesh et al. 1994; Takahashi et al. 2001). Eine Differenzierung und nähere Charakterisierung der Zellarten vor ihrer weiteren Nutzung fand nicht statt.

Bridger et al. (2007) gelang es auf Basis der Arbeit von Zeiler et al. (2007), Karunkel-epithelzellen aus Plazentomen zu gewinnen, diese zu kultivieren und zu charakterisieren. Es wurde die Bovine Caruncular Epithelial Cell Line 1 (BCEC-1) etabliert. Damit wurde die Grundlage geschaffen, weiterführende in vitro Studien direkt an den am feto-maternalen Austausch beteiligten Zellen gravidier Tiere durchzuführen.

Das Alter der Feten wurde mit Hilfe der Scheitel-Steißlänge auf vier Monate geschätzt. Zunächst wurden maternaler und fetaler Teil des Plazentoms manuell separiert. Mit Hilfe eines Kollagenase-Verdau mit 200 U/ ml Kollagenase I wurden epitheliale Zellen aus der Karunkel herausgelöst. Nach einer Zentrifugation wurde das Pellet in Medium resuspendiert und in Kulturflaschen ausgesät (Bridger et al. 2007). Eine gleichzeitige Anheftung epithelialer und fibroblastoider Zellen machte es nötig, bei den ersten drei bis vier Passagierungen (Bridger et al. 2007) die nicht-epithelialen Zellen herauszuselektieren. Möglich wurde dies durch die schnellere Ablösung der Fibroblasten unter Trypsin-Einwirkung. Markerproteine für epitheliale Zellen, wie Zytokeratin und Zonula Occludens-I wurden dauerhaft, auch bei bereits kryokonservierten Zellen, mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen. Vimentin, ein Protein, das eigentlich kein Epithelzell-Marker ist, wurde ebenso gefunden. In

Epithelzell-Kulturen ist dies allerdings nicht ungewöhnlich (Classen-Linke et al. 1996; Johnson et al. 1999; Galabova-Kovacs et al. 2004). Negative Ergebnisse zeigten sich bei der Untersuchung auf die Muskelzell-Proteine α -sm Aktin und Desmin. Dieses und eine fehlende LDL-Aufnahme (low density lipoprotein) in die Zellen ließen den Ausschluss einer endothelialen Kontamination zu.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen wiesen typische Merkmale eines (polarisierten) Epithels, nämlich einen apikalen Mikrovillisaum und junktionale Komplexe wie Zonula occludens, Zonula adherens und Desmosomen nach (Bridger et al. 2007). Die Zellen wurden in Fibronektin-beschichteten Inserts eines Transwell-Systems kultiviert. Waren diese zu ca. 95% mit Zellen bedeckt, wurde der transepitheliale elektrische Widerstand (TEER) als Beweis einer intakten, polarisierten Zellschicht gemessen. Werte ab 200 Ω galten dabei als Richtmaß.

Die Methode der TEER-Messung zum Nachweis einer intakten Barriere ist bereits von zahlreichen Gruppen wie Buse et al. (1995), Bowen et al. (1996) oder Wakabayashi et al. (2007) angewendet worden. Hierbei zeigte sich eine Korrelation zwischen erhöhter Quantität und Komplexität junktionaler Komplexe und steigendem Widerstand (Bowen et al. 1996).

BCEC-1 wurden BVD-Virus frei getestet, zeigten sich jedoch empfänglich für das Virus. Eine weitere Epithelzelllinie aus dem Endometrium des Rindes (BEND) (Johnson et al. 1999), welche in der American Type Culture Collection (ATCC) hinterlegt wurde, unterscheidet sich unter anderem in der Tatsache, dass die Zellen BVD positiv getestet sind.

Eine Problematik bei der Isolation der bovinen Karunkelepithel-Zellen aus dem Plazentom stellt die Kontamination des Karunkelepithels mit Trophoblastzellen nach der manuellen Separation dar (Takahashi et al. 2001).

Die maternale, chromosomale Identität der BCEC-1 wurde daher durch eine Fluoreszenz in situ Hybridisierung bewiesen (Bridger et al. 2007). Da die Trophoblastzellen von einem männlichen Fetus stammten, konnte das y-Chromosom als Differenzierungs-Merkmal herangezogen werden.

BCEC-1 wurden bis zur Passage 32 erfolgreich für weitergehende Studien subkultiviert und kryokonserviert (Bridger et al. 2007). Von Passage 9 bis Passage 11 verfielen die Zellen in ein verlangsamtes Wachstum, um schließlich über alle nachfolgenden Subkultivierungen bis Passage 30 eine deutlich schnellere

Vermehrung zu zeigen. Dieses Phänomen wurde mit einer spontanen Immortalisierung erklärt, wie sie auch bei Soule et al. (1990) beschrieben ist.

Übereinstimmungen zwischen nach ähnlichem Protokoll gewonnen Zellen mit in vivo herrschenden Verhältnissen, waren bereits von derselben Arbeitsgruppe anhand der Integrin-Expression gefunden worden (Zeiler et al. 2007). Integrine dienen der Adhäsion zwischen den Zellen einerseits, zwischen Zellen und extrazellulärer Matrix andererseits, sowie der Signaltransduktion. Uterine epitheliale Zellen und uninukleäre Trophoblastzellen exprimierten sowohl in vivo als auch in Primärkultur Laminin und den dazugehörigen Integrin-Rezeptor $\alpha_6\beta_1$. Diese Beobachtung deckte sich mit der Studie von Pfarrer et al. (2003) zur Verteilung von Integrinen im plazentären Gewebe von Rindern.

1.1.4 Veterinärmedizinische Bedeutung des Zellmodells BCEC-1

Die Plazenta des Rindes steht in direktem Zusammenhang mit wirtschaftlichen Überlegungen und Interessen. Wird der Fetus intrauterin infiziert, werden fetotoxische Substanzen übertragen oder wird die Nachgeburt verhalten (Laven & Peters 1996), so hat dies unweigerlich ökonomische Folgen. Daher ist die komplikationslose, physiologisch verlaufende Gravidität ein großes Anliegen der landwirtschaftlichen Nutztierhaltung. Die Erforschung der dabei ablaufenden Vorgänge und eine mögliche positive Einflussnahme stellen wichtige veterinärmedizinische Ziele dar.

Bei einer Nachgeburtsverhaltung trennen sich fetale Kotyledone und maternale Karunkel nicht vollständig voneinander. Die Folge ist eine sekundäre Keimbesiedelung mit anschließender Entzündungsreaktion. Langfristig ist die Entstehung einer Reproduktionsstörung möglich (Pelissier 1972). Bei Kühen mit Nachgeburtsverhaltung tritt zudem gehäuft Milchfieber auf (Pelissier 1972).

Im Rahmen der normalen plazentaren Reifung flacht das Karunkel-Epithel ab. Plazenten, die nicht physiologisch abgehen, zeigen jedoch keine Reduktion der Zellhöhe (Björkman & Sollen 1960).

Zudem stellten sowohl Williams et al. (1987) als auch Gross et al. (1991) im Zusammenhang mit dem Phänomen der Nachgeburtsverhaltung eine fehlende präpartale Abnahme der binukleären Zellen fest. Die letztgenannte Gruppe wies eine

Beeinflussbarkeit dieser Vorkommnisse durch Glukokortikoide und Prostaglandine nach.

Für die Ermittlung der genauen Ursachen und Vorgänge sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig. Ein passendes in vitro Modell kann hierfür hilfreich sein, da in vivo Versuche nur in begrenztem Umfang möglich sind.

Zu den wichtigen intrauterinen Infektionen gehört die Bovine Virus Diarrhö (BVD), hervorgerufen durch das BVD-Virus, ein Pestivirus. Je nach Zeitpunkt einer diaplazentaren Infektion innerhalb der ersten 100 Tage kommt es entweder zu Fruchtresorption, Abort, Missbildungen oder zur Geburt persistierend infizierter Tiere (Thiel et al. 1996). Infizierte Kälber haben eine erworbene Immuntoleranz gegenüber dem ncp-Stamm (nicht-zytopathogen) und können sich klinisch unauffällig verhalten oder als Kümmerer geboren werden. Sie sind Virusausscheider. Sowohl eine Mutation des ncp-Stammes als auch eine Superinfektion mit dem zytopathogenen Stamm (cp) haben bei diesen Tieren die sogenannte Mucosal Disease zur Folge. Aufgrund des letalen Verlaufs der Erkrankung ist sie von großem wirtschaftlichen Interesse.

Für Untersuchungen bezüglich BVD bietet sich die Etablierung eines in vitro Modells an. Bislang wurden für solche Studien stets Zelllinien verwendet, die nicht aus der bovinen Plazenta isoliert wurden, wie Madin-Darby Bovine Kidney Cells (Becher et al. 2001; Lackner et al. 2004; Lee et al. 2005) oder Bovine Calf Kidney Cells (Loehr et al. 1998).

Auch die Überwindung der Plazentarschranke durch nicht-infektiöse, fetotoxische Stoffe ist für die Viehwirtschaft ein ökonomisch relevanter Faktor. Der Einsatz von Medikamenten oder die Aufnahme bestimmter Pflanzen und anderer umweltassoziierten Substanzen während der Trächtigkeit stellt, wegen des möglichen Transfers auf den Fetus, einen kritischen Punkt dar. Nachgewiesen ist ein Übertritt über die Plazenta - ohne Spezifizierung auf das Rind - für Inhalationsnarkotika, Barbitursäure-Derivate (antikonvulsiv, sedierend, hypnotisch, narkotisch), Chloralhydrat (narkotisch), Steroid-Narkotika, morphinähnliche Analgetika, Neuroleptika, Antiepileptika und Lokalanästhetika (Jauniaux et al. 1996; Capece et al. 2002; Frey & Löscher 2002; Andaluz et al. 2003; Carney et al. 2004; Littleford 2004; Fresno et al. 2008). Unter Anderem werden Thiobarbiturate auf fetaler Seite angereichert. Zwar weisen durch eine Sectio caesarea entwickelte Neugeborene wegen eines höheren Wassergehaltes des Gehirns keine Narkose auf, doch ist eine

oxidative Entgiftung bei Jungtieren nicht möglich. Folglich liegt eine verlängerte Wirkzeit vor (Frey & Löscher 2002).

Bei einigen weiteren Pharmaka werden Warnungen vor möglichen, fetotoxischen Wirkungen gegeben. So konnte in Laboruntersuchungen an Ratten und Kaninchen eine teratogene, fetotoxische Wirkung von Trimethoprim (in Kombination mit Sulfonamiden) als Mittel gegen Infektionen der Atmungsorgane, des Magen-Darm-Traktes, des Harn- und Geschlechtsapparates, der Gelenke und der Haut nachgewiesen werden (Helm et al. 1976; Plumb 1995). Zwar liegen keine Ergebnisse einer Anwendung bei Rindern vor, doch ein vergleichbarer Effekt kann nicht ausgeschlossen werden.

Oxytetracyclin ist ein Antibiotikum, welches bei Infektionen von Urogenital-, Respirationstrakt, bei Klauengeschwüren, Mastitis und Anaplasmose eingesetzt werden kann. Da es Störungen der fetalen Skelettentwicklung hervorrufen kann, ist eine Applikation in der ersten Hälfte der Trächtigkeit kontraindiziert (Plumb 1995). Schrickx et al. (2007; 2008) konnten zeigen, dass es sich bei dem Medikament um ein Substrat des P-Glycoproteins handelt, welches für den Transport diverser Chemotherapeutika verantwortlich ist (siehe unten).

Der Einsatz von Antibiotika bei Infektionen des Muttertieres in nicht plazentarer Lokalisation, kann folglich mit einem eventuellen Risiko für den Fetus behaftet sein.

Von der Anwendung bestimmter Antiparasitika, wie Doramectin während der letzten 60 Tage vor dem Abkalben, wird von Herstellern wie Pfizer abgeraten. Studien zu möglichen negativen Wirkungen solcher Substanzen auf den Fetus liegen jedoch nicht vor. Untersuchungen konzentrieren sich vielmehr auf positive Effekte auf das Muttertier, mit besserer Massenzunahme und Futterverwertung (Purvis et al. 1994; Loyacano et al. 2002).

Aus der Umwelt per inhalationem oder per os aufgenommene Substanzen stellen regional unterschiedliche Gefahrenquellen dar. So wirkt Nikotin als Spindelgift und verhindert dadurch Mitosen (Liu et al. 2008). Die orale Aufnahme von Alkaloiden aus *Lupinus* spp., wie *Lupinus sericus*, *caudatus*, *laxiflorus*, *leucophilus*, *formosus* und *arboreus*, ruft Deformationen des Fetus, das sogenannte „Crooked calf syndrome“, hervor (Keeler & Panter 1989). Relevante Alkaloide sind Anagyrin, ein Quinolizidin-Alkaloid, und Piperidin-Alkaloide wie das Ammodendrin. Untersuchungen hierzu wurden stets als Fütterungsversuche in vivo durchgeführt. Über die Details der Übertragungswege liegen keine näheren Informationen vor.

1.2 Transport

1.2.1 Membranständige Transportsysteme - Allgemeines

Um ihren Wirkort zu erreichen, müssen zahlreiche Substrate zuerst die Doppellipidmembran der Zelle überwinden. Weisen sie eine hohe Lipidlöslichkeit auf, sind ungeladen und von geringer Größe, wie beispielsweise Ethanol, so können sie entlang eines Konzentrationsgefälles passiv, also energieunabhängig, durch die Membran diffundieren (Szachowicz-Petelska et al. 2001).

Geladene Teilchen und größere Moleküle sind auf Membrantransportproteine angewiesen, die in die Lipidschicht eingelagert sind. Diese Transportsysteme können zum einen anhand ihres Energieverbrauchs in aktiven und passiven Transport eingeteilt werden. Für den aktiven Transport wird ATP benötigt. Ob ein Transporter primär oder sekundär aktiv ist, hängt von der direkten Kopplung an eine ATP-Hydrolyse ab: Bei den primär aktiven Transportern wird ATP unmittelbar gespalten. Hingegen beim sekundär aktiven, baut ein ATP-verbrauchender Schritt einen Konzentrationsgradienten auf, der wiederum die Triebkraft für den Transporter darstellt.

Zum anderen unterscheidet man nach funktionellen Kriterien Ionenkanäle, Ionenpumpen und Carrier.

Ionenkanäle bilden Poren durch die Membran, deren Transportrate und -Richtung vom elektrochemischen Potential abhängig ist. Sie transportieren also passiv und sind zudem nicht sättigbar.

Ionenpumpen hingegen befördern Ionen unter direktem ATP-Verbrauch. Man spricht von primär aktiven Transportern. Hierzu gehört die $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$.

Die Arbeitsweise der Carrier gestaltet sich sehr unterschiedlich. Man differenziert zwischen einem Uniport, bei dem das Substrat nur in eine Richtung gebracht wird, einem Antiport, bei welchem das Substrat nur im Austausch gegen ein anderes transportiert wird sowie einem Symport. Der Symporter bewegt mehrere Substanzen gleichzeitig in dieselbe Richtung. Dies kann sowohl passiv, als auch aktiv, entgegen einem Gradienten, erfolgen. Generell ist der Transport durch Carrier sättigbar. (Hediger et al. 2004)

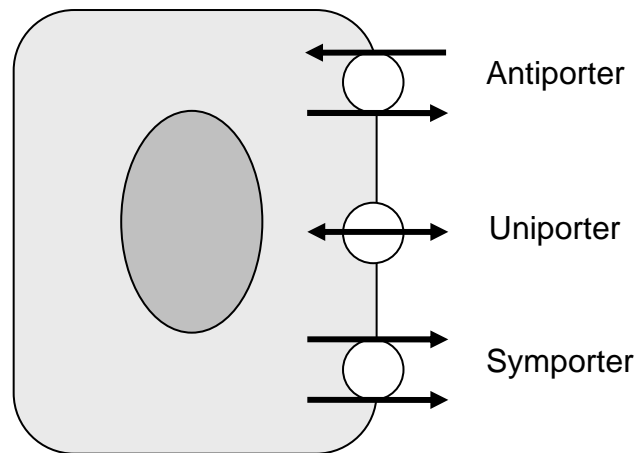


Abb. 1: Transportmechanismen durch die Zellmembran

1.2.2 ABC-Transporter

Der Begriff „ABC-Transporter“ wurde erstmals 1992 in einem Review von Higgins et al. eingeführt und steht für „ATP-binding cassette“ Transporter. Neben dem Menschen gehören auch Bakterien, Hefen und andere Säuger zu den exprimierenden Organismen. Die humane ABC-Transporter-Familie umfasst 49 Vertreter. Anhand von Ähnlichkeiten in der Genstruktur, Anordnung der Domänen und deren Sequenzhomologien werden die Mitglieder der ABC-Familie in sieben Subfamilien untergliedert (Dean et al. 2001 Review; Choudhuri & Klaassen 2006 Review). Die Subfamilien sind ABCA mit 12, ABCB mit 11, ABCC mit 13, ABCD mit vier, ABCE mit einem, ABCF mit drei und ABCG mit fünf Vertretern. Gemeinsam ist ihnen eine auch zwischen den Spezies hochkonservierte ATP-Bindungs-Kassette.

Die ABC-Transporter gehören zu den primär aktiven Transportern. Das heißt, sie spalten unmittelbar ATP für den Transport ihres jeweiligen Substrates. Möglichkeit dazu bietet ihnen ihre Struktur: Der Prototyp eines ABC-Transporters setzt sich aus zwei hydrophoben transmembranen Domänen (TMD) zusammen, von denen jede je eine hydrophile Nukleotid-Bindungsdomäne für ATP (NBD oder ABC-Domäne genannt) auf der Zytosolseite aufweist (Schneider & Hunke 1998).

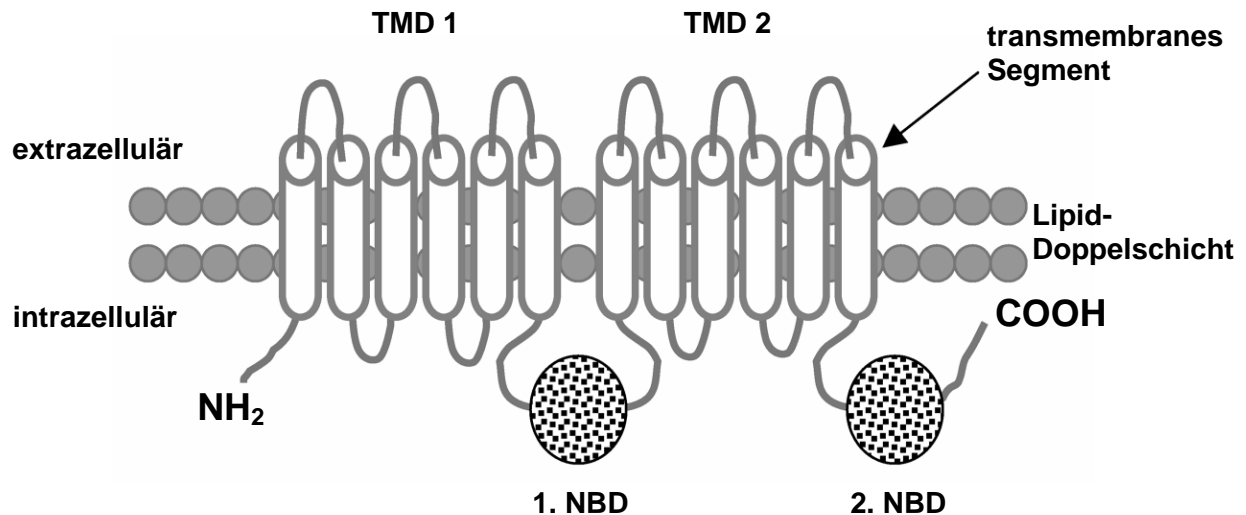


Abb. 2: Struktur eines typischen ABC-Transporters

(modifiziert aus Choudhuri & Klaassen 2006)

Eine NBD setzt sich aus drei charakteristischen Sequenzmotiven, Walker A, Walker B und ABC-Signatur-Motiv, zusammen. Walker A und B werden durch 90 bis 120 Aminosäuren voneinander getrennt. Die ABC-Signatur befindet sich stromaufwärts der Walker B-Region und ist spezifisch für alle ABC-Transporter.

Jede Transmembrandomäne wiederum spannt sich in sechs α-helikalen Segmenten durch die Membran. Diese sind für die Substratspezifität bestimmend (Dean et al. 2001).

Es wird generell in Voll-Transporter und Halb-Transporter unterschieden. Der seltenere Halb-Transporter besitzt im Gegensatz zum oben beschriebenen Prototypen lediglich je eine Ausführung einer jeden Domäne. Um funktionell aktiv sein zu können, müssen sie entweder als Homodimere oder Heterodimere arbeiten. Beispiel für einen solchen Halb-Transporter ist das BCRP (Breast Cancer Resistance Protein).

Die Funktion der unidirektional arbeitenden ABC-Transporter liegt in der Verlagerung von Lipiden, Gallensäuren, Peptiden für die Antigenpräsentation, Aminosäuren, Zuckern, Metallionen und Xenobiotika von einem Kompartiment ins andere. Man findet sie sowohl in zytoplasmatischen als auch in Zellorganell-Membranen wie denen des Endoplasmatischen Retikulums, der Mitochondrien und der Peroxisomen (Dean et al. 2001; Choudhuri & Klaassen 2006). Damit kommt ihnen nicht nur eine

protektive Funktion zu, sondern sie sind zusätzlich verantwortlich für die Entstehung von Resistenzen gegenüber Pharmaka. Als besonders problematisch haben sie sich in der Chemotherapie von Krebserkrankungen gezeigt. Viele Tumorzellen überexprimieren die kodierenden Gene und sorgen so für eine schnellere Ausschleusung der Therapeutika aus der Zelle (Cole & Deeley 1998).

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit behandelte ATP-Binding-Cassette-Transporter sind BCRP (Breast Cancer Resistance Protein / ABCG2), MRP1 (Multidrug Resistance Related Protein / ABCC1) und P-Glycoprotein, auch MDR1 genannt, als Produkt des *MDR1* Gens (Multidrug Resistance / ABCB1). Laut Nomenklatur werden Gene im Unterschied zu Proteinen kursiv geschrieben, humane Vertreter groß und tierische klein.

BCRP/bcrp oder ABCG2

Nachdem man die starke Resistenz der Zelllinie „MCF breast cancer cells“ gegenüber bestimmten Pharmaka wie Mitoxantron, Doxorubicin und Daunorubicin sowie eine verringerte Resistenz gegenüber Anthrazyklinen und Camptothezinen nicht mit P-Glycoprotein oder Multidrug Resistance Related Protein erklären konnte, wurde die Existenz eines weiteren ABC-Transporters von Doyle et al. (1998) vermutet und aufgedeckt. Die Gruppe nannte dieses neue Protein Breast Cancer Resistance Protein. Allikmets et al. (1998) detektierten das gleiche Protein in der humanen Plazenta und nannten es ABCP (placenta specific ABC transporter). Wegen seiner starken Mitoxantron-Resistenz wurde es von Miyake et al. (1999) als Mitoxantrone Resistance Protein (MXR) bezeichnet. Nach der heutigen Nomenklatur ist das Breast Cancer Resistance Protein unter dem Namen ABCG2 bekannt (Özvegy et al. 2001). Es gehört also zur ABCG-Subfamilie.

Der ABCG2 ist ein 655 Aminosäuren großer Halbtransporter, der als Homodimer arbeitet.

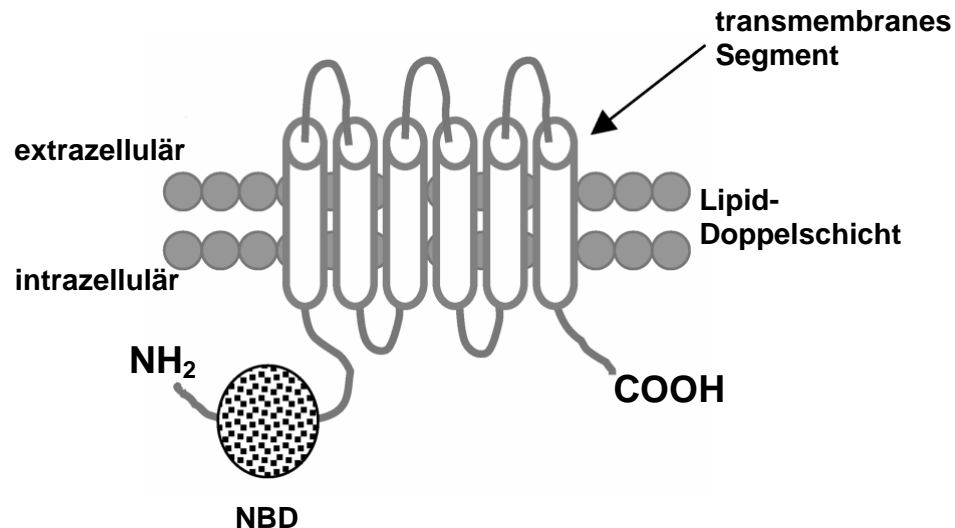


Abb. 3: Struktur eines Halbtransporters wie ABCG2

(modifiziert aus Choudhuri & Klaassen 2006)

Sowohl ABCG2 mRNA als auch das Protein wurden in zahlreichen Geweben nachgewiesen. Die mRNA wurde insbesondere in hypoxischen Gebieten detektiert (Krishnamurthy & Schuetz 2006). Das Protein findet sich speziesspezifisch in Plasmamembranen verschiedener Gewebe wieder. Auch in Zellkulturuntersuchungen, wie an (bereits genannten) MCF7/MX-Zellen oder der S1-M1-3.2 Kolon Karzinoma-Zelllinie, wurde das Protein in der Plasmamembran detektiert (Rocchi et al. 2000; Borst & Elferink 2002). Polarisierte Zellen wie LLC-PK1 und MDCK-II exprimierten es in der apikalen Membran (Jonker et al. 2000).

Zu beobachten ist das ABCG2-Protein weiterhin in den apikalen Membranen von humanem plazentarem Synzytiotrophoblasten, muriner Niere, in Hepatozyten, Epithelzellen von Dünndarm und Kolon, venösem und kapillärem Endothel, Endothel von Bluthirnschranke und Lunge (Leslie et al. 2005) und in Mammagewebe (Maliepaard et al. 2001; Choudhuri & Klaassen 2006). Auch hämatopoetische Vorläuferzellen exprimieren ABCG2. Besonders stark ist er jedoch in plazentarem Gewebe (Allikmets et al. 1998; Doyle et al. 1998) und laktierendem Mammagewebe vertreten (Jonker et al. 2005).

Mögliche funktionelle Rollen lassen sich von der Lokalisation dieses Efflux-Transporters ableiten: Eine protektive Wirkung für den Fetus, eine Regulierung der

oralen Aufnahme verschiedener Substrate und eine Eliminierung von Metaboliten über Galle und Niere sind denkbar.

Zu den zahlreichen organischen Substraten des BCRP gehören mit Sulfat, Glucuronid, Glutamat oder Glutathion konjugierte Steroide, Xenobiotika und andere Moleküle. Aber auch unkonjugierte organische Anionen wie Methotraxat werden transportiert (Mao & Unadkat 2005).

Die Xenobiotika Topotectan, Cimetidin, Aciclovir, Nitrofurantoin, Fluorchinolone wie Ciprofloxacin, Ofloxacin werden von BCRP während der Laktation von Maus, Mensch und Kuh mit der Milch ausgeschieden und so an Neonaten oder Konsumenten von Kuhmilch weitergegeben (Jonker et al. 2005). Physiologische Substrate sind unter Anderem Folsäure, Porphyrine wie Vitamin B12, Flavonoide, Pheophorbide A und Dehydroepiandrosteronsulfat (Krishnamurthy & Schuetz 2006). Teilweise kommt es zu einem gemeinsamen Substratspektrum mit P-gp und MRP1, wie bei den Anthrazyklinen Topotectan und Mitoxantron (Mao & Unadkat 2005).

MRP1/mrp1 oder ABCC1

MRP1 gehört mit 1531 Aminosäuren zu den größeren MRPs. Strukturell unterscheiden sich die MRPs von den bisher besprochenen ABC-Mitgliedern. Sie bestehen aus drei Transmembran-Domänen (TMD), von denen die erste fünf und die beiden anderen jeweils sechs Segmente aufweisen, sowie aus zwei intrazellulär lokalisierten NBDs. Außerdem findet sich das N-terminale Ende bei MRP1 extrazellulär wieder. (Choudhuri & Klaassen 2006).

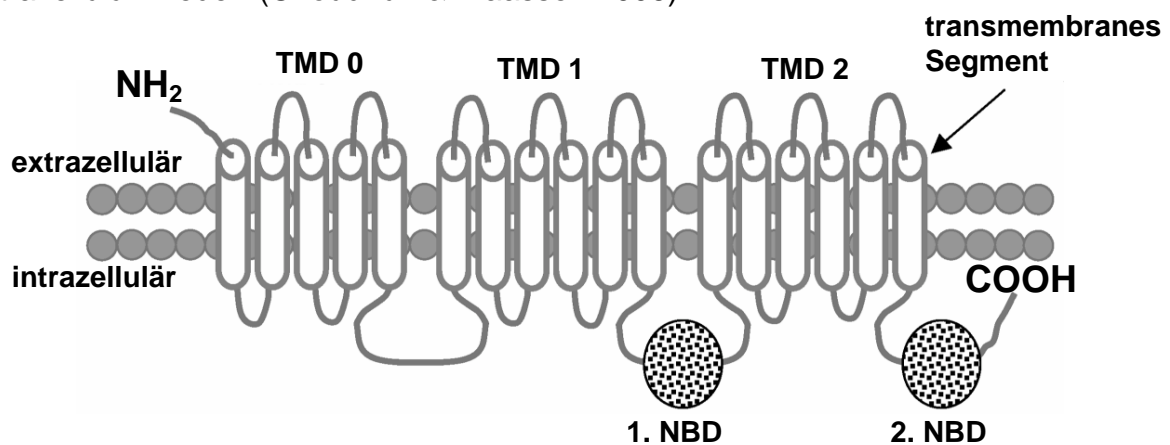


Abb. 4: Struktur des MRP1

(modifiziert aus Choudhuri & Klaassen 2006)

Zu den Substraten von MRP1 gehören unter Anderem Leukotrien C₄, D₄ und E₄, Gluthation- (GSH) Konjugate von Aflatoxin B₁, Prostaglandin A₂, Glucuronid-Konjugate von Estradiol 17βD, Etoposid und Bilirubin, Sulfat-Konjugate wie Estron-3-Sulfat und Dehydroepiandrosteron-3-Sulfat, aber auch Substanzen wie Anthrazyklin-Antibiotika, Vinka-Alkaloide und Folate. (Borst & Elferink 2002; Leslie et al. 2005; Choudhuri & Klaassen 2006). Allerdings spielen Anthrazykline wie Doxorubicin, Daunorubicin und Epirubicin bei Maus, Ratte, Rind (Taguchi et al. 2002) und Hund als Substrate eine vernachlässigbare Rolle.

MRP1 transportiert speziesspezifisch neutrale oder basische amphipatische Stoffe, Oxyanionen (wie Arsenit und Antimonit) ebenso wie organische Anionen, wie Konjugate mit Sulfat, GSH oder Glucuronaten. Der Transport unkonjugierter Substanzen durch MRP1 ist jedoch von der Bereitstellung freien Glutathions abhängig. Daher wird der Transporter auch als GS-X-Pumpe bezeichnet (Cole & Deeley 1998; Borst 1999; Borst & Elferink 2002).

Im Unterschied zu ABCG2 findet sich ABCC1 in der baso-lateralen Membran epithelialer Zellen zahlreicher Gewebe, wie Niere, Darm, Lunge, Hoden und Plazenta. Auch die Bluthirnschranke weist MRP1 auf. Im Unterschied zu anderen Lokalisationen ist der Transporter hier apikal in Endothelzellen zerebellärer Mikrogefäße zu finden (Leslie et al. 2005).

In der humanen Plazenta ist MRP1 in Endothelzellen fetaler Blutgefäße und in der basolateralen Membran des Synzytiotrophoblasten zu beobachten (Atkinson et al. 2003; Nagashige et al. 2003). Aus diesen Lokalisationen wird eine protektive Funktion gegenüber dem Fetus abgeleitet. Eine Akkumulation von Xenobiotika im Trophoblasten wird verhindert, während fetale Abfallprodukte in konjugierter Form an die maternale Zirkulation abgegeben werden (St-Pierre et al. 2000).

Eine protektive Rolle des MRP wird ebenso für alle anderen Lokalisationen angenommen. MRP1 bietet Schutz gegenüber chemischen Toxinen und oxidativem Stress. Über den Transport von Leukotrienen nimmt MRP1 zudem scheinbar Einfluss auf das Entzündungsgeschehen (Cole & Deeley 1998).

MDR1/mdr1 oder ABCB1

Die Subfamilie ABCB wird auch als Familie der MDR-ABC Transporter (multidrug resistance ABC Transporter) bezeichnet und beinhaltet elf Mitglieder, unter ihnen

MDR1/mdr1. Letzterer gehört zu den strukturell größten Vertretern der ABCB-Subfamilie und wird auch ABCB1 genannt. Das Protein des humanen ABCB1, welches als P-Glycoprotein bezeichnet wird, besteht aus 1280 Aminosäuren und ist 170 kDa schwer.

Juliano und Ling stellten 1976 die Resistenz einer Zelllinie (Chinese hamster ovary cells) gegenüber Colchizin und zahlreichen weiteren amphiphilen Stoffen fest. In diesem Zusammenhang entdeckten sie ein bis dahin unbekanntes Membran-Glykoprotein, welches sie auf den Namen P-Glycoprotein, kurz P-gp (P = permeability) taufen. Später wurde P-gp physiologischer Weise sowohl in hämatopoetischen Stammzellen (Chaudhary & Roninson 1991) als auch in zahlreichen normalen Geweben des Menschen festgestellt. Hierzu gehören unter anderem Leber, Niere, Pankreas, Kolon, Jejunum und Nebenniere (Thiebaut et al. 1987) sowie Trophoblast, kapilläre Endothelzellen mit Barrierefunktion wie in der Blut-Hirn-Schranke (Cordon-Cardo et al. 1990). Allen gemeinsam ist die apikale Lokalisation des Proteins. So exprimieren zum Beispiel Hepatozyten P-gp in der kanalikulären Membran, Enterozyten in der luminalen Membran und Nierenepithelzellen in der tubulären. Diesem Expressionsmuster und seiner Funktion als Effluxpumpe entnahm man, dass P-gp eine wichtige Rolle sowohl bei der Verteilung als auch bei Sekretion und Exkretion von Metaboliten und bestimmten Chemotherapeutika in Galle, Urin und Gastrointestinaltrakt einnimmt und das Eindringen verschiedener Substanzen ins Gewebe verhindert (Thiebaut et al. 1987; Cordon-Cardo et al. 1990; Fromm 2004). Besondere Beachtung hat der Efflux-Mechanismus in der chemotherapeutischen Behandlung von Krebszellen gewonnen. Bei einer Überexpression von P-gp gelangen Therapeutika nicht in ausreichendem Maße in die Krebszelle. Die Krebszelle zeigt sich therapieresistent. (Ambudkar et al. 1999)

Strukturell unterscheidet P-gp sich nicht vom Prototypen eines ABC-Transporters. Auch P-gp besteht aus zwei Transmembran-Domänen mit je sechs Segmenten und zwei intrazellulär gelegenen Nukleotidbindungs-Domänen.

Der Mensch besitzt lediglich ein *MDR1*-Gen, wohingegen bei der Maus zwei Gene, nämlich *mdr1a* und *mdr1b* dieselben Aufgaben übernehmen. Mit Hilfe der von Schinkel et al. (1994) generierten Knockout-Mäuse, denen die für P-gp kodierenden Gene fehlen, konnten MDR1-Substrate und ihr Transport in vivo untersucht werden (Schinkel et al. 1995).

Die Substrate des MDR1 sind sehr variabel. Es gehören metabolische Produkte, Lipide, Peptide, Sterole, Pharmaka und andere Xenobiotika dazu. Gemein ist ihnen ein hydrophober oder amphipatischer organischer Charakter. Sie sind zwischen 300 und 2000 Dalton groß und viele besitzen mindestens zwei planare aromatische Ringe (Ueda et al. 1997). Sie können kationisch, anionisch oder auch ungeladen sein. Die bestehende Resistenz überexprimierender Tumorzellen gegenüber derart verschiedenen Substanzen wird in dem Namen MDR für multidrug resistance zusammengefasst.

Da die großen Unterschiede der Substrate in chemischer Struktur und physikochemischen Eigenschaften keine Vorhersage über die Bindungsfähigkeit an P-Glycoprotein zulassen, lieferten die von Schinkel (1994) generierten Knockout-Mäuse eine neue Untersuchungs-Möglichkeit.

Mittlerweile kennt man eine Vielzahl von anti-tumorösen Chemotherapeutika, Antibiotika, Antimykotika, Immunsuppressiva, Antacida, Glukokortikoiden, Opioiden und vielen anderen Substanzen, die Substrate für P-gp darstellen.

Tab. 1. : Beispiele für P-gp Substrate

Antibiotika	Immunsuppressiva	Glucocorticoide
Erythromycin	Cyclosporin	Aldosteron
Tetracyclin	Tacrolimus	Cortisol
Rifampin	Valspodar	Dexamethason
Antimykotika	Antiepileptika	Antacida
Itrakonazol	Phenobarbital	Cimetidin
Ketokonazol	Phenytoin	Ranitidin
Anti-tumoröse Chemotherapeutika	Andere	Opioide
Daunorubicin	Colchicin	Morphine
Etoposid	Ivermectin	Pentazocin
Mitoxantron	Loperamid	Methadon
Paclitaxel	Progesteron	Antiarrhythmika
Vinblastin	Rhodamin123	Digoxin
Vincristin		Verapamil

(Schinkel et al. 1995; Ambudkar et al. 1999; Gottesman et al. 2002; Fromm 2004; Choudhuri & Klaassen 2006)

Ein veterinärmedizinisch relevantes Substrat ist im Zusammenhang mit der Expression von P-Glycoprotein in den Focus gerückt: Das makrozyklische Lakton Ivermectin, ein häufig genutztes Antiparasitikum, wirkt bei einigen Vertretern bestimmter Hunderassen, die einen *mdr1*-Defekt aufweisen, neurotoxisch. Auch bei *mdr1a* Knockout-Mäusen ist eine solche Wirkung bereits beobachtet worden (Schinkel et al. 1994). Lankas und Cartwright machten 1997 ähnliche Beobachtungen an einer Subpopulation von CF-1-Mäusen (cystic fibrosis). Feten solcher Mäuse zeigten nach Behandlung mit Avermectin B1a Gaumenspalten.

Die Ursache für den caninen Gendefekt ist eine Deletion von vier Basenpaaren. Folge davon ist ein vorzeitiger Kettenabbruch (Mealey et al. 2001; Roulet et al. 2003). Bei homozygoten Hunden mit diesem Defekt, wird ein Ivermectin-sensitiver Phänotyp evident. Ein nicht funktionelles Protein wird exprimiert, so dass der physiologische und damit schützende Efflux des Substrates durch die Endothelzellen zurück ins Blut vermindert ist. Das Substrat tritt ins Gehirn über und ruft neurotoxische Symptome wie Ataxie, Mydriasis, Somnolenz und Salivation hervor. In vielen Fällen verläuft das Geschehen letal. Betroffene Rassen sind unter anderem Collie, Australian Shepherd und Shetland Sheepdog (Geyer et al. 2005). Neben Ivermectin sind zahlreiche andere Pharmaka wie Moxidectin oder Loperamid verantwortlich für neurotoxische Nebenwirkungen bei betroffenen Hunden.

P-gp-Inhibitoren und ihre Verwendung

In der Humanmedizin versucht man seit den 80-iger Jahren durch Einsatz und Entwicklung von P-gp-Inhibitoren (Modulatoren), Einfluss auf die Transportaktivität des Proteins zu nehmen. Dieses dient vor allen Dingen der erfolgreichen Therapie von multi-resistenten Tumoren. Die Gruppe der Inhibitoren umfasst, genau wie die der Substrate, zahlreiche strukturell sehr verschiedene Stoffe. Eine Mehrzahl an Modulatoren weist lipophile Eigenschaften auf, gelangt also per diffusionem in die Zelle und lagert sich dort an die Substratbindungsstelle an. Die Substrate können entweder kompetitiv verdrängt oder deren Bindung beeinflusst werden.

Heute gibt es drei Generationen von Inhibitoren (Dantzig et al. 2003; Choudhuri & Klaassen 2006), die nicht nur klinisch, sondern auch in vitro genutzt wurden oder werden.

Die erste Generation beinhaltet Substanzen, die ursprünglich für andere Indikationen eingesetzt wurden. Dazu gehören der Calcium-Kanal-Blocker Verapamil und das Immunsuppressivum Cyclosporin A. Beide sind wenig potent und nicht selektiv (Germann et al. 1997). Die für die Beeinflussung von P-gp notwendige Plasmakonzentration liegt oftmals oberhalb der therapeutischen Breite, so dass als großer Nachteil dieser Gruppe unerwünschte Nebenwirkungen auftreten (Fisher et al. 1996). Letztere ergeben sich aus ihrer ursprünglichen Indikation (Raderer & Scheithauer 1993; Nobili et al. 2006).

Die zweite Generation wurde speziell für die Inhibition von P-gp entwickelt. Sie sollte geringere Nebenwirkungen provozieren. Hierzu gehören unter Anderem Valspodar (PSC833) (Boesch et al. 1991; Watanabe et al. 1995), Dexverapamil (Toffoli et al. 1995), ein R-Isomer des Verapamils, und Biricodar (VX-710) (Minderman et al. 2004). Valspodar ist dem Cyclosporin A strukturell sehr ähnlich, hat aber keine Immunsuppression zur Folge. Zwar weist es eine 10 bis 20fach größere Aktivität als sein Vorläufer Cyclosporin A auf, zeigt klinisch aber nur moderate Erfolge (Perez-Tomas 2006). Es wird heute vor allen Dingen in vitro genutzt. Teilweise wird eine Inhibition zweier oder mehrerer ABC-Transporter sowohl in der ersten als auch in der zweiten Generation beobachtet (Minderman et al. 2004; Perez-Tomas 2006). So inhibiert Biricodar beispielsweise nicht nur P-gp, sondern ebenso MRP1 und BCRP (Minderman et al. 2004).

Die dritte Generation zielt auf erhöhte Spezifität für jeweils nur einen ABC-Transporter bei geringen Nebenwirkungen und guten klinischen Effekten ab. Zosuquidar 3HCl (LY335979) (Dantzig et al. 1996; Starling et al. 1997) ist ein solcher reiner P-gp-Inhibitor, ebenso wie Tariquidar (XR9576).

Inhibitoren werden häufig in der Forschung eingesetzt, um eine P-gp-Aktivität in Zellen nachzuweisen. Verschiedene Herangehensweisen werden dafür genutzt. Eine Möglichkeit besteht darin, den Efflux des P-gp-Substrates Rhodamin123 zu blockieren. In der Folge akkumuliert dieser Fluoreszenzfarbstoff in der Zelle und kann mikroskopisch (Lorke et al. 2001; De Rosa et al. 2008), spektrophotometrisch (Clark et al. 1996; Constable et al. 2006), mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) (Gaillard et al. 2000; Cox et al. 2001) oder flow-zytometrisch (Chaudhary & Roninson 1991; Hegewisch-Becker et al. 1998; Haritova et al. 2007) dargestellt werden.

Früher wurde Rhodamin123 vorwiegend genutzt, um Mitochondrien in lebenden Zellen spezifisch anzufärben (Johnson et al. 1980). Später stellte man einen Zusammenhang zwischen P-gp und dem Efflux des Farbstoffes fest. Der Einsatz der Inhibitoren Verapamil und Reserpin bei resistenten und sensitiven Zellen untermauerte die vermuteten Zusammenhänge (Neyfakh 1988; Neyfakh et al. 1989). Ein weiteres Beispiel eines fluoreszierenden P-gp-Substrates, welches methodisch ähnlich genutzt wird, ist das Calcein-AM (AM = Acetoxymethylester) (Utoguchi et al. 2000; Evseenko et al. 2006; Zaja et al. 2008).

Mittlerweile existieren kommerziell erhältliche Kits, die diese Farbstoffe für die P-gp-Diagnostik enthalten.

Die genannten Inhibitoren werden außerdem genutzt, um den Transport anderer z.B. radioaktiv-markierter P-gp Substrate zu blockieren. Für die Markierung werden hier gerne das Herzglykosid Digoxin (Schinkel et al. 1995) und die Vinkaalkaloide Vincristin und Vinblastin. (Horio et al. 1989; Ushigome et al. 2000) verwendet.

1.3 MDR1 in der Plazenta

Lankas et al. (1998) untersuchten die Wirkung des Avermectin B1a-Photoisomers L-652,280 an zuvor genotypisierten CF-1 Mäusen. Aufgrund des Aufbaus der Mäuseplazenta als Plazenta haemotrichorialis, in der das Endometrium bis auf die maternalen Bluträume abgebaut wird, wurde geschlossen, dass in der Maus die fetale Plazenta hauptverantwortlich für die Protektion vor toxischen Einflüssen sein müsste. Die toxikologischen Untersuchungen konzentrierten sich daher auf die Feten. Es zeigte sich, dass Feten, die homozygot negativ für *mdr1a* (-/-) waren, zu 100% Gaumenspalten entwickelten, während solche, die homozygot positiv für *mdr1a* (+/+) waren, in keinem Fall Gaumenspalten aufwiesen. Immunhistochemisch wurde P-gp in fetalen Epithelzellen mit Kontakt zum maternalen Blut lokalisiert (Lankas et al. 1998; Pavék et al. 2003). Damit scheint eine Beteiligung von plazentarem P-gp bei der Abwehr schädlicher Substanzen bewiesen.

Smit et al. (1999) griffen die Arbeit von Lankas et al. (1998) auf und untersuchten die Übertragung weiterer P-gp-Substrate, namentlich Paclitaxel, Saquinavir und Digoxin an genotypisierten CF-1 Mäusen. Mit P-gp-Inhibitoren PSC833 und GG918 ließ sich

der P-gp vermittelte Transport unterbinden und die transplazentare Passage bei homozygot positiven (+/+) und heterozygoten Tieren erhöhen.

Auch bei der Ratte konnte in der Plazenta sowohl *mdr1a* als auch *mdr1b* mRNA nachgewiesen werden (Leazer & Klaassen 2003). Untersuchungen zur funktionellen Aktivität von P-gp in der Ratte wurden anhand eines Tiermodells durchgeführt (Pavek et al. 2003). Mittels Perfusion der Plazenta mit Rhodamin123 stellte man einen Flux in feto-maternaler Richtung fest. Bei Einsatz von Inhibitoren (PSC833 und andere) konnte eine Erhöhung des Fluxes in materno-fetaler Richtung bei gleichzeitiger Erniedrigung in feto-maternaler Richtung festgestellt werden. Die Gruppe wies P-gp immunhistochemisch in der apikalen Membran der zweiten Synzytiotrophoblast-Schicht nach. Diese Schicht stellt in der haemotrichorialen Plazenta die Barriere zwischen maternalem Blut und fetalen Plazentateilen dar.

Zwar ist bekannt, dass bovine Kapillar-Endothelzellen des Gehirns P-gp aufweisen (Rose et al. 1998; Cox et al. 2001; Liu & Liu 2001), doch die Gewebeverteilung im Rind ist bislang nicht beschrieben. Untersuchungen zur Expression von *mdr1* in der Rinderplazenta liegen nicht vor.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die bovine Plazenta als ökonomischer Faktor einerseits und die limitierten Möglichkeiten, gestationsbedingte Vorgänge in vivo untersuchen zu können andererseits, machen die Etablierung eines Zellmodells für in vitro Untersuchungen so interessant. Unter diesem Vorsatz entwickelten Bridger et al. die Bovine Caruncular Epithelial Cell Line 1 (BCEC-1).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Zelllinie auf eine mögliche Nutzung als in vitro Modell für plazentaren Transport untersucht werden.

Da sich sowohl in der Humanmedizin als auch bei Maus und Ratte die ABC-Transporter, mit P-gp als dem am besten untersuchten Protein, durch ihre protektive Funktion für den Fetus hervorragen haben und P-gp ein sehr breites Substratspektrum abdeckt, konzentrierten sich die Untersuchungen auf diesen Effluxtransporter.

Bisherige Studien legten ihren Fokus aufgrund der Anatomie der Nager- und Humanplazenta stets auf den fetalen Anteil, da sich dort gezeigt hatte, dass P-gp

einen Efflux aus der fetalen Plazenta heraus antreibt. Der Frage jedoch, ob auch auf maternaler Seite ein Mechanismus besteht, der die entsprechenden Substrate zunächst zum Fetus passagiert, ging man nicht nach.

Der speziesspezifische plazentare Aufbau erlaubt keine direkte Übertragung bisheriger Studien auf das Rind. Publikationen bezüglich bislang untersuchter Tierarten können lediglich Anhaltspunkte bieten.

Da Untersuchungen am Rind zwangsläufig das maternale Epithel als erste Barriere berücksichtigen müssen, sollte zunächst die grundsätzliche Existenz der drei ABC-Transporter P-Glycoprotein, bcrp und mrp1 in der Bovine Caruncular Epithelial Cell Line 1 als Repräsentant der maternalen Barriere geklärt werden. Im Weiteren sollten die Funktionalität und Lokalisation von P-gp in BCEC-1 nachgewiesen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

Die vorliegende Zelllinie ist die erste dokumentierte, etablierte und patentierte Zelllinie boviner Karunkel­epithelzellen. Gewonnen wurde sie aus Plazentomen von im vierten Monat trächtigen Schlachtkühen (Bridger et al. 2007).

Die Kontinuität bestimmter Markerproteine (Zytokeratin, ZO-1, Vimentin) dieser Zelllinie ist über mehrere Passagen hinweg dokumentiert, um ihr Fortbestehen im Verlaufe einer längeren Kultivierung bestätigen zu können. Eine über längeren Zeitraum kultivierbare Zelllinie bietet die Möglichkeit, in vitro bestimmte zelluläre und interzelluläre Vorgänge zu betrachten, ohne auf ein Tiermodell angewiesen zu sein.

Alle Arbeiten mit Zellen erfolgten unter möglichst sterilen Bedingungen unter Benutzung einer Sterilbank.

Zellkulturmedium (Medium)

Als Standardmedium wurde DMEM/HAM's F12 verwendet. Hiervon wurden 500ml mit 1% Penicillin/ Streptomycin, 2 mM Glutamin und 10% steril-fil­triertem, hitzeinaktiviertem FKS angesetzt. Bei jedem Medienwechsel erhielten die Zellen zusätzlich 0,5% ITS (Insulin-Transferrin-Selenium-X). Vor Gebrauch wurden alle Medien auf 37°C erhitzt.

Kultivierung von Zellen

Nach dem sichtbaren Auftauen der kryokonservierten Zellsuspension bei 37°C wurden die gelösten Zellen vorsichtig mit einer serologischen Pipette in ein 15 ml fassendes Röhrchen überführt. Nun wurden tropfenweise 3 ml FKS hinzugegeben und nach jedem Tropfen einige Sekunden lang das Röhrchen geschwenkt. Weitere 6 ml FKS wurden langsam hinzupipettiert. Anschließend wurde für 5 Minuten bei 900 U/min ohne Bremse zentrifugiert, das überstehende FKS abgenommen und das Pellet in ½ Medium und ½ FKS aufgenommen und in eine Zellkulturflasche gegeben. Nach 6-8 Stunden bei 37°C in einem CO₂-Inkubator (5% CO₂) fand eine mikroskopische Kontrolle der Anheftung statt. Bei positiver Bewertung wurde das

Medium getauscht. Von nun an erhielten die Zellen alle 2-4 Tage, je nach Verfärbung des Mediums, neues Medium.

Mikroskopische Kontrolle

Eine tägliche Kontrolle des Zellwachstums fand mit Hilfe eines lichtmikroskopischen Invers-Mikroskopes der Firma Carl Zeiss statt.

Subkultivierung

Waren die Zellen konfluent, das heißt, bedeckten sie als Monolayer mindestens 80% der Bodenfläche eines Kulturgefäßes und standen untereinander in engem Kontakt, so wurden sie passagiert bzw. subkultiviert.

Die Passagierung beschreibt den Vorgang der Ablösung der Zellen voneinander und von der Bodenfläche des Kulturgefäßes sowie das Überführen dieser Zellen in ein neues Kulturgefäß. Dieser Vorgang dient zum einen der Vermehrung der Zellen, zum anderen der Bereitstellung von Zellen für Versuchsserien.

Zunächst wurde das Medium aus der 75 cm² großen Kulturflasche abgesaugt. Danach fand ein zweimaliges Waschen der Zellen mit je 3-5 ml Hanks' Puffer without Ca & Mg statt, um Reste des FKS von den Zellen zu entfernen und Ca²⁺-abhängige Zelladhäsionsmoleküle zu inhibieren. Anschließend wurden 3 ml 0,5%iges Trypsin in PEM mit 2 mM EDTA auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden für insgesamt 5 Minuten bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach zwei Minuten jedoch wurde die Flasche für kurze Zeit herausgenommen, geschwenkt und dagegen geklopft, um bereits angelöste Zellen in die Flüssigkeit zu überführen. Für die verbliebene Zeit kamen die Zellen wieder in den Inkubator. Am Ende der 5 Minuten fand eine mikroskopische Kontrolle der Zellen mit einem Invers-Mikroskop statt. Immer noch haftende Zellen wurden durch erneutes Klopfen gelöst. Der enzymatische Verdau wurde durch Zugabe von 12 ml Medium mit FKS gestoppt. In Einzelfällen, wenn noch ein großer Anteil der Zellen angeheftet war, wurde ein Cell Scratcher zu Hilfe genommen. Die Benutzung beschränkte sich jedoch auf wenige Anwendungen.

Nach der Resuspension der Zellen wurden diese für 5 Minuten bei 900 U/min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und das Pellet entsprechend der gewünschten Verdünnung in frischem Medium gelöst und je nach

Verwendungszweck subkultiviert, z.B. auf Deckgläschen, in Kulturflaschen, in Well-Platten.

Zur Bestimmung der Zellzahl kam eine Zählkammer nach Neubauer zur Anwendung. In Abhängigkeit der gewählten Verdünnung der Subkultur, musste alle 5 bis 7 Tage eine erneute Passage vorgenommen werden. Die BCEC-1 fanden in der vorliegenden Arbeit Verwendung bis Passage 26.

Kryokonservierung der Zellen

Zellen, die nicht für die Subkultur oder Versuche benötigt wurden, wurden nach der Resuspension erneut für 5 Minuten bei 900 U/min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Als Medium für die Kryokonservierung diente 1 ml eines Gemisches aus 60% DMEM/Ham's F12, 30% FKS und 10% DMSO. Die Zellen wurden über Nacht entweder bei -20°C oder in einem Cryo 1°C freezing Container bei -80°C gelagert, um am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff (-196°C) umgelagert zu werden. Dort verblieben die Proben bis wieder neue Zellen für die Kultur benötigt wurden.

2.1.1 Kultivierung im Transwell-System

Für Transportmessungen wurden die Zellen in sogenannten Inserts kultiviert, welche in 12-Wellplatten stehen. Ein Insert enthält eine Polyester-Membran mit 12 mm Durchmesser und 0,4 µm großen Poren.

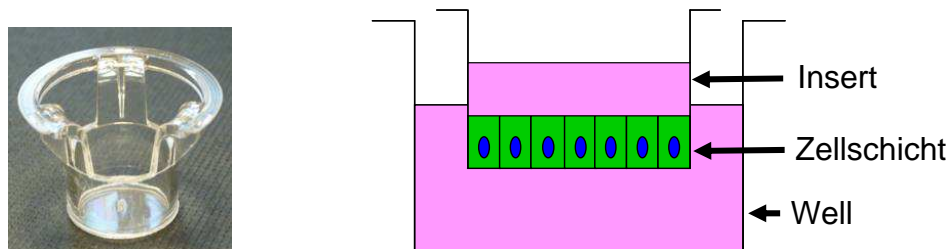


Abb. 5: Darstellung eines Inserts

links Insert Fa. Corning Inc., Polyester Membran, 0,4 µm Poren, 12 mm Durchmesser; *rechts* Transwell-Modell

Die Inserts wurden für 30-45 min bei Raumtemperatur mit Fibronectin (16,67 µg/ml Hanks' BSS without Ca & Mg) beschichtet: 350 µl der Fibronectin-Verdünnung inkubierten im Insert und 850 µl im Well. Anschließend wurde einmalig mit Hanks' BSS without Ca & Mg gespült.

Die gewünschte Zellverdünnung wurde in DMEM/Ham's F12 hergestellt und davon je 0,5 ml in die Inserts pipettiert. Die Wells wurden mit 2ml Medium befüllt. Ein Medienwechsel fand am darauf folgenden Tag statt. Danach richtete sich die Häufigkeit des Medienwechsels nach Farbe des Mediums und Zustand der Zellen.

2.2 mRNA-Nachweis mittels Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Nach der Isolierung der RNA aus Gewebe oder Zellen, wird diese zunächst durch eine RNA-abhängige DNA-Polymerase in einen komplementären DNA-Strang (cDNA) transkribiert, was den Vorgang der reversen Transkription (RT-) beschreibt. Im weiteren Verlauf werden ausgehend von dieser cDNA zahlreiche Replikate eines definierten DNA-Fragments prozessiert. Hierfür benötigt man einen sich wiederholenden Zyklus von Denaturierung der DNA-Matrize, Hybridisierung – das heisst, Bindung der eingesetzten Primer an die DNA – und Amplifikation, also Verlängerung der Primer mit Neusynthese der zwischen ihnen liegenden Abschnitte. Dieser Zyklus wird in dem Begriff der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zusammengefasst, welche 1985 von Kary Mullis entwickelt wurde. Die PCR bietet nun die Möglichkeit, die Anzahl der Matrizes für die Herstellung von mRNA (messenger RNA) zu erhöhen und dadurch auch die mRNA-Menge, so dass eine Detektion erleichtert wird. Die mRNA wird im Rahmen der Transkription mithilfe von RNA-Polymerasen aus der DNA bzw. der prä-m-RNA (hnRNA) generiert. Hierbei dockt die Polymerase am 5'-Ende (Cap) an und transkribiert in Richtung des 3'-Endes (PolyA-Schwanz).

2.2.1 RNA-Extraktion aus Zellen und Gewebe

Für die Aufreinigung der RNA wurden nur RNase-freie Materialien und Lösungen verwendet und Schutzhandschuhe getragen. Zur Anwendung kam das RNeasy® Plus

Mini Kit (Qiagen), bei welchem selektive Bindungseigenschaften einer Silikagelmembran genutzt werden.

Nach Lyse und Homogenisierung des zu untersuchenden Materials (Zellen oder Gewebe) mittels eines denaturierenden, Guanidin-Isothiocyanat-haltigen Puffers zur Inaktivierung der RNasen, wurde die Probe durch eine gDNA Eliminator-Säule von der genomischen DNA befreit. Der anschließende Zusatz von Ethanol sollte gute Bedingungen schaffen für die Bindung der RNA an die Membran der nachfolgend, zur Entfernung von Kontaminanten genutzten Säule. Für die Eluierung der RNA aus dieser Membran wurde RNase-freies Wasser genutzt.

Zur Gewinnung von RNA aus BCEC-1 wurden diese solange in Ø6cm-Schälchen kultiviert, bis sie konfluent waren. Nach Entfernung des Mediums, wurden die Zellen dreimalig mit Hanks' BSS without Ca & Mg gewaschen. Es wurden 600 µl Lyse-Puffer (RLT) in die Kulturschale gegeben. Der RLT-Puffer war zur reversiblen Inaktivierung von RNasen mit β-Mercaptoethanol versetzt. Mit Hilfe eines Cell Scratchers konnte der Zellrasen gelöst werden. Die Suspension wurde in ein Reaktionsgefäß überführt, mit einem Vortexgerät gemischt und in ein QIAshredder Spin column pipettiert.

Bei der Extraktion aus Gewebe unterschied sich das Vorgehen lediglich in diesen ersten Schritten:

Das bei -80°C aufbewahrte Gewebe wurde kurz angetaut und dann in ein Reaktionsgefäß gegeben. Nach Zugabe von 300 µl RLT-Puffer inklusive β-Mercaptoethanol wurde das Gewebe mit Hilfe eines Mörsers zerkleinert um schließlich in weiteren 300 µl des Puffergemisches gelöst zu werden. Ab hier wurde ebenso wie bei der RNA-Extraktion aus Zellen verfahren: Es ging weiter mit der Überführung des Lysates in ein QIAshredder Spin column.

Das folgende Protokoll gilt für beide Materialien:

- 2 min Zentrifugation (13000 U/min)
- Überführung des durchgeflossenen Lysates in eine gDNA Eliminator-Säule
- 30 sek Zentrifugation (13000 U/min)
- filtriertes Lysat (DNasen-freie RNA) mit dem gleichen Volumen Ethanol (70%) mischen

- 700 µl des Gemisches inklusive der Präzipitate in ein RNeasy Spin Column pipettieren
- 15 sek Zentrifugation bei 13000 U/min
- filtrierte Flüssigkeit aus dem Reaktionsgefäß verwerfen
- 700 µl RW1-Puffer auf die Säulenmembran geben
- 60 sek Zentrifugation bei 13000 U/min
- Filtrat verwerfen
- 500 µl des RPE-Puffers auf die Säule
- 15 sek Zentrifugation bei 13000 U/min
- Filtrat verwerfen
- 500 µl des RPE-Puffers auf die Säule
- 2 min Zentrifugation bei 13000 U/min
- Filtrat verwerfen
- 1 min Zentrifugation bei 13000 U/min
- Säule in ein neues RNase-freies Reaktionsgefäß stellen
- 35 µl Wasser (RNase-frei) auf die Säulenmembran
- 1 min stehen lassen
- 1 min Zentrifugation bei 13000 U/min

Das gewonnene Lysat entspricht der in Wasser gelösten RNA.

2.2.2 Konzentrationsbestimmung der RNA

Die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration erfolgte unter Nutzung der Quant-iT Technology mit einem Invitrogen Qubit™ Gerät. Hierbei wird die spezifische Bindung eines fluoreszierenden Farbstoffes an die RNA ausgenutzt.

Zunächst musste eine Arbeitslösung angesetzt werden: Das Quant-iT™ RNA Reagenz wurde 1:200 in Quant-iT™ RNA Puffer gelöst. Mit Hilfe dieser Arbeitslösung wurden zwei Standards folgendermaßen hergestellt: Je 190 µl der Arbeitslösung wurden in ein RNase-freies, mitgeliefertes Reaktionsgefäß pipettiert, mit 10 µl eines ebenfalls mitgelieferten Standards versetzt und 2 bis 3 Sekunden lang gevortext.

Für die Messung der RNA-Proben mussten diese zunächst in einem Mischungsverhältnis von 1:300 in TE-Puffer verdünnt werden. Hiervon wurden je 10 µl mit 190 µl der Arbeitslösung in einem Reaktionsgefäß gelöst. Die Verdünnung

wurde für 2 bis 3 Sekunden gevortext und anschließend 2 Minuten stehen gelassen, damit sich Luftblasen aus der Probenflüssigkeit entfernen konnten. Für die Kalibrierung des Qubit-Gerätes mussten zunächst die Standards nacheinander gemessen werden. Hiernach fand die Messung der Proben statt.

Die dabei angegebene Konzentration in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ musste aufgrund der Verdünnung der RNA mit dem TE-Puffer noch mit 300 multipliziert werden:

Ergebnis Qubit x 300 = RNA-Konzentration

2.2.3 Reverse Transkription

Zur Herstellung einer Matrize für die eigentliche PCR muss zunächst eine cDNA-Erststrangsynthese erfolgen.

Hierfür wurden das SuperScript III Reverse Transcriptase Kit (Invitrogen), Random Primer (Promega; c = 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und ein RNase-Inhibitor (Applied Biosystems) eingesetzt. Alle Puffer und Reaktionsansätze wurden auf Eis gelagert.

Tab. 2. : Pipettierschema 1 für die reverse Transkription

Komponente	19,5 μl -Ansatz	Stammkonzentration
4 μg RNA	x μl	
RT-Primer (Random-Primer)	0,5 μl	500 mM
dNTP-Mix	1 μl	0,1 mM
RNase-freies Wasser	auf 13 μl Gesamtvolumen auffüllen	

Das Gemisch wurde für 5 Minuten bei 65°C im Heizblock inkubiert und anschließend 3 Minuten lang auf Eis heruntergekühlt. Nach einer kurzen Zentrifugation wurde folgendermaßen weiterpipettiert:

Tab. 3. : Pipettierschema 2 für die reverse Transkription

Komponente	19,5 μl -Ansatz	Stammkonzentration
5x First-Strand Buffer*	4 μl	5x
DTT	1 μl	0,1 M
RNase-Inhibitor	0,5 μl	20 U/ μl
SuperScript III	1 μl	

*5X first-strand buffer: 250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl_2

Die Probe wurde kurz durch vorsichtiges Hoch-'Runterpipettieren gemischt, bevor sie im Thermocycler nachstehendes Programm durchlief:

1. 25°C 5 min
2. 50°C 50 min
3. 70°C 15 min

Es folgte eine Abkühlung auf 4°C, bevor die entstandene cDNA entweder bei -20°C aufbewahrt oder direkt für weitere Untersuchungen verwendet wurde.

Verwendete PCR-Primer

Die MDR1-, BCRP-, und β -Actin-Primer wurden von MWG Biotech AG, Ebersberg synthetisiert. Nachdem das Lyophilisat in RNase-freiem Wasser entsprechend der Herstellerangaben und der gewünschten Verdünnung gelöst wurde, konnte das Substrat bei -20°C gelagert werden. Primer für MRP1 und OATP1A2 wurden dankenswerter Weise vom Institut für Pharmakologie und Toxikologie der JLU Gießen zur Verfügung gestellt.

Tab. 4. : Primer, ihre Sequenzen, ihre Amplifikatgrößen und NCBI Accession Nummern

Primer	Primersequenzen (5'→3')	Amplifikatgröße	NCBI Acc.-Nr.
MDR1 forward	TTC ACC CAG GCA ATG ATG TA	682 bp	XM_590317
MDR1 reverse	CCA GAG AGC TGA GTT CCT TTG T		
BCRP forward	TGT TTG ATA GCC TCA CCT TGT TG	639 bp	NM_001037478
BCRP reverse	TAT AGT ATC CAC TGA TAT ATT CAT G		
MRP1 forward	ACT TTC TGG CTT ATA GCC CTA CTG	336 bp	NM_174223
MRP1 reverse	TTC TGA CGT GTC CTC CTT ATT CAG		
OATP1A2 forward	CAT GAT CAC ACA AAT AGA AAG AC	290 bp	NM_174654
OATP1A2 reverse	TCT GGG TTC CAT TTT CCA TAC AC		

Als Kontrolle der PCR-Reaktion sowie zur Prüfung der Qualität der eingesetzten cDNA kamen bei jeder PCR auch β -Actin-Primer zur Anwendung.

Tab. 5. : β -Actin Primer, Sequenzen, Amplifikatgröße

β -Actin forward	ATC TGG CAC CAC ACC TTC TAC AAT GAG CTG CG	800 bp
β -Actin reverse	CGT CAT ACT CCT GCT TGC TGA TCC ACA TCT GC	

Für jedes Primerpaar wurde als Kontrolle der Reinheit eine Nullkontrolle mitgeführt, bei welcher Wasser statt cDNA eingesetzt wurde.

2.2.4 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die PCR-Reaktion wurde mit dem Taq PCR Kit von NEB durchgeführt. Alle Puffer und Reaktionsansätze wurden auf Eis gelagert.

Tab. 6. : Pipettierschema für einen 50 μ l PCR-Ansatz

Komponente	50 μ l-Ansatz	Stammkonzentration
Standard Taq Reaction Buffer *	5 μ l	10x
Nuklease-freies H ₂ O	37,5 μ l	
Taq-Polymerase	0,2 μ l	0,02 U/ μ l
dNTP	1 μ l	200 μ M
Downstream Primer	2 μ l	10 μ M
Upstream Primer	2 μ l	10 μ M
cDNA	2 μ l	

*10x Standard Taq Reaction Buffer: 100 mM Tris-HCl (pH 8), 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂

Aufgrund der unterschiedlichen T_m-Werte der beiden MDR-1-Primer wurde für diese folgendes Cycler-Programm als Touchdown-PCR gewählt:

Deckelheizung auf 105°C

- | | |
|--------------------|------------------------|
| 1. 5 min bei 95°C | (Initial Denaturation) |
| 2. 30 sek bei 94°C | (Denaturation) |
| 3. 30 sek bei 64°C | (Annealing) |
| 4. 1 min bei 68°C | (Extension) |

5. 10 malige Wiederholung der Schritte 2-4 unter Reduzierung der Temperatur in Schritt 3 um 1°C je Wiederholung, so dass eine Endtemperatur von 53°C erreicht wurde
6. 30 sek bei 94°C **(Denaturation)**
7. 30 sek bei 53°C **(Annealing)**
8. 1 min bei 68°C **(Extension)**
9. 27 malige Wiederholung der Schritte 6-8
10. 5 min bei 72°C **(Final Extension)**
11. 4°C bis zum Herausnehmen der Proben

Da die T_m -Werte der anderen Primer sich nicht wesentlich voneinander unterscheiden, konnte hier auf eine Touchdown-PCR verzichtet werden:

Deckelheizung auf 105°C

1. 5 min bei 95°C **(Initial Denaturation)**
2. 30 sek bei 94°C **(Denaturation)**
3. 30 sek bei: 53°C für das BCRP-Produkt
56°C für das MRP-Produkt
57°C für β -Actin
54°C für OATP1A2 **(Annealing)**
4. 1 min bei 68°C **(Extension)**
5. 39 malige Wiederholung der Schritte 2-4
6. 5 min bei 72°C **(Final Extension)**
7. 4°C bis zum Herausnehmen der Probe

Die Proben wurden entweder bei 4°C für eine weitere Verwendung bis spätestens am folgenden Tag oder bei -20°C für längere Aufbewahrung gelagert.

2.2.5 Gelelektrophorese

Eine horizontale Agarose-Gelelektrophorese diente der Auftrennung der erhaltenen PCR-Produkte, um diese unter Einsatz von interkalierendem Ethidiumbromid zu visualisieren.

Für die Herstellung des Agarosegels wurden zunächst 2 g Agarose in einem Erlenmeyer-Kolben abgewogen und mit 1 x TAE-Laufpuffer auf 100 g aufgefüllt. Die Lösung wurde vorsichtig in der Mikrowelle unter mehrmaligem Schwenken bis zum vollständigen Auflösen aufgekocht. Gewichtsverlust durch Verdampfen wurde mittels Wiegen festgestellt und durch Zugabe von destilliertem Wasser behoben. Nach Zugabe von 3 µl Ethidiumbromid zu dem etwas abgekühlten Gemisch, wurde dieses luftblasenfrei in einen Elektrophorese-Schlitten gegossen, welcher mit einem Taschen formenden Kamm versehen war. Der Kamm wurde nach dem Erstarren des Gels entfernt und das Geltablett nun in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Letztere wurde mit 1 x TAE-Puffer befüllt bis das Gel 0,5 cm hoch bedeckt war. Zur Beschickung der Geltaschen wurden 20 µl der jeweiligen PCR-Produkte mit 4 µl eines 6 x Loading Dye Puffers versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Für den Größenvergleich der Fragmente wurde zusätzlich ein Standard-Molekulargrößen-Marker (100 bp) in die Randtaschen gegeben. Es folgte eine 85 Minuten lange Elektrophorese bei 58 Volt. UV-Licht diente der Detektion der Amplifikate. Bilder wurden mittels einer High Resolution CCD-Kamera aufgenommen und dokumentiert. Für spätere Sequenzierungen wurden die sichtbar gemachten Banden mit sterilen Skalpellens aus dem Gel ausgeschnitten, in sterile Probengefäße gegeben und entweder sofort aufgereinigt oder bei -20°C gelagert.

2.2.6 Aufreinigung der DNA und Sequenzierung

Für die Aufreinigung der ausgeschnittenen DNA wurde das QIAquick Gel Extraction Kit von Qiagen verwendet.

Die Gelstücke wurden zunächst gewogen. Pro 100 mg Gel wurden 100 µl des mitgelieferten QG-Puffers hinzupipettiert. Eine 10 minütige Inkubationszeit bei 50°C unter gelegentlichem Mischen sorgte für ein Auflösen des Gelstückes. Im Falle der MRP-Amplifikate wurden zu je 100 mg Gel 100 µl Isopropanol hinzugegeben. Dieser

Schritt soll die DNA-Ausbeute von Produkten unter 500 bp erhöhen. Die Lösung wurde auf eine QIA Quick Säule pipettiert und 1 Minute lang bei 13000 U/min zentrifugiert. Der Durchfluss konnte verworfen werden. Bevor in einem Waschschrift 750 µl des gelieferten PE-Puffers auf die Säule gegeben wurden, sorgte die Zugabe von 500 µl QG-Puffer mit anschließender einminütiger Zentrifugation für die Entfernung der restlichen Agarose aus der Probe. Der Durchfluss des PE-Puffers wurde nach einminütiger Zentrifugation ebenfalls verworfen. Eine Entfernung letzter Pufferreste konnte mittels einer erneuten Zentrifugation erzielt werden. Die Säule wurde in ein neues Probengefäß gestellt und erst für eine Minute mit 35 µl RNase-freiem Wasser inkubiert, bevor sie für eine Minute zentrifugiert und 30 µl des Durchflusses nochmals auf die Membran pipettiert wurden. Eine weitere Inkubation und Zentrifugation für jeweils eine Minute sollten die Ausbeute der DNA erhöhen.

Die DNA-Konzentration wurde spektrophotometrisch gemessen:

Die Proben wurden 1:50 in Tris-Puffer verdünnt und anschließend in einer Küvette im kalibrierten Spektrophotometer analysiert.

Entsprechend der ermittelten Konzentration wurde das nötige Volumen errechnet, um 6 ng MRP-, 10 ng BCRP- und 11 ng MDR-1-DNA mit je 0,5 µl Primer zu mischen und mit Hilfe von Wasser ein Gesamtvolumen von 7 µl zu erreichen. Die Proben wurden kommerziell von SRD Scientific Research and Development GmbH, Oberursel sequenziert.

Verwendete Sequenzierungs-Primer

Jedes aufgereinigte Produkt musste zur genauen Analyse einmal vorwärts und einmal rückwärts sequenziert werden. Da bei MDR-1 der Anfang und das Ende der Sequenzierung mit den in der PCR verwendeten Primern nicht eindeutig sequenziert wurden, mussten zusätzliche Primer hergestellt werden. Diese Primer sollten die fehlenden Bereiche überbrücken und eine restlose Sequenzierung der aufgereinigten Amplifikate ermöglichen.

Tab. 7. : Für die Sequenzierung verwendete Primer, ihre Sequenzen, NCBI Accession Nummern

Primer	Primersequenzen (5'→3')	NCBI Acc.-Nr.
MDR-1 forward	TTC ACC CAG GCA ATG ATG TA	XM_590317
MDR-1 reverse	CCA GAG AGC TGA GTT CCT TTG T	
MDR-1-vorne reverse	GGT CGA GTG GGG TAG TTG AA	XM_590317
MDR-1-hinten forward	GTG TTA ATC GAT GGC AAG GA	
BCRP forward	TGT TTG ATA GCC TCA CCT TGT TG	NM_001037478
BCRP reverse	TAT AGT ATC CAC TGA TAT ATT CAT G	
MRP-1 forward	ACT TTC TGG CTT ATA GCC CTA CTG	NM_174223
MRP-1 reverse	TTC TGA CGT GTC CTC CTT ATT CAG	

2.3 Immunfluoreszenz-Untersuchung: Nachweis und Lokalisierung von P-Glycoprotein in BCEC-1

Die Immunhistochemie dient dem Nachweis und der Lokalisierung von Antigenen in Zellen und Geweben. Dafür werden, wie bei der hier vorliegenden indirekten Immunhistochemie, gegen diese Strukturen gerichtete Primär-Antikörper eingesetzt, die daran binden und mit Hilfe spezieller Marker angefärbt werden. Die Marker setzen sich zusammen aus einem Sekundärantikörper, der gegen die Tierart gerichtet ist, aus der der Primärantikörper generiert wurde, und einem daran konjugierten Fluoreszenzfarbstoff. Bei der Immunfluoreszenz müssen die Farbstoffe durch Licht bestimmter Wellenlänge angeregt werden, um im Mikroskop sichtbar zu werden.

Vor der eigentlichen Färbung müssen Zellen auf Deckgläsern kultiviert werden. Sind sie konfluent, werden sie zuerst fixiert, um ihren Vitalzustand zu konservieren. Die hierbei verwendete Methode sollte den Konformationszustand des zu untersuchenden Antigens möglichst nicht verändern. Daher gilt es, für den jeweiligen Primärantikörper die passende Fixationsmethode zu eruieren. Häufig verwendete

Methoden sind z.B. die Inkubation mit eiskaltem Methanol oder Aceton. Auch Paraformaldehyd in verschiedenen Verdünnungen wird verwendet.

Ein weiterer sensibler Schritt der Immunhistochemie ist die Permeabilisierung, die für die Detektion intrazellulär gelegener Epitope notwendig sein kann. Mögliche Substanzen sind beispielsweise Triton, Tween, Digitonin und andere. Es handelt sich hierbei um Detergenzien.

Eine Blockierung mit Hilfe von Serum, welches dieselbe tierartliche Herkunft hat, wie der Sekundärantikörper, sorgt für die Minimierung unspezifischer Bindungen letzterer.

2.3.1 Protokoll für die Immunfluoreszenz

Um eine bessere Haftung der Zellen auf den Deckgläsern zu ermöglichen, wurden diese vor ihrer Verwendung wie folgt behandelt:

Zuerst fand eine 45 Minuten dauernde Inkubation in einem auf dem Rüttler stehenden Gefäß mit 1N HCl statt. Es folgten ein Waschschritt mit destilliertem Wasser und das Einlegen der Deckgläser in 100% Ethanol, bevor sie schließlich einzeln auf Papier getrocknet wurden. Anschließend wurden sie autoklaviert.

Die sterilen Deckgläser wurden in 24-Wellplatten gelegt und dienten als Kultivierungsfläche für die BCEC-1 (Protokoll für die Subkultivierung siehe 2.1). Sobald die Zellen die gewünschte Dichte erreicht hatten, konnte das Medium entfernt werden und die Immunfluoreszenz-Färbung erfolgen.

Sofern im Folgenden nicht ausdrücklich auf Abweichungen hingewiesen wird, fand die Behandlung der Zellen in der 24-Wellplatte statt. Während der Inkubationszeiten war die Platte auf einem Schwenker platziert.

- kurzes Waschen mit PBS 1x
- 4 min Waschen mit PBS 1x
- *Fixierung*: 10 min mit 2%igem PFA (gelöst in PBS) bei Raumtemperatur
- 3 mal je 5 min Waschen in PBS 1x
- *Permeabilisierung*: 10 min mit 0,005%igem Digitonin (gelöst in PBS) bei Raumtemperatur
- 5 min waschen in einer Mischung aus PBS 1x und 1% BSA

- *Blockierung*: 30 min mit 10% Donkeyserum (in einer Mischung aus PBS 1x und 1% BSA)
- kurzes Waschen in einer Mischung aus PBS 1x und 1% BSA
- 5 min Waschen in einer Mischung aus PBS 1x und 1% BSA
- *Primärantikörper*: 1:20 gelöst in einer Mischung aus PBS 1x und 1% BSA; die Deckgläser aus der Wellplatte herausnehmen und mit je 30 µl der Antikörperverdünnung für 60 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubieren
- 3 mal je 5 min Waschen in einer Mischung aus PBS 1x und 1% BSA
- *Sekundärantikörper*: 1:2000 gelöst in einer Mischung aus PBS 1x und 1% BSA; die Deckgläser aus der Wellplatte herausnehmen und mit je 30 µl der Antikörperverdünnung für 60 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubieren
- 3 mal je 5 min Waschen in PBS 1x
- *Kernfärbung*: 5 min Höchst 33342 (1 µg/ml in PBS 1x gelöst) im Dunkeln
- 2 mal kurzes Spülen in PBS 1x
- 3 mal je 5 min Waschen in PBS 1x
- die Deckgläschen mit einer Pinzette entnehmen und in destilliertem Wasser schwenken
- vorsichtig Flüssigkeit abtropfen lassen und auf Objektträgern eindeckeln mit ProLong® Gold Antifade Reagent (Invitrogen)
- über Nacht Lagerung bei Raumtemperatur
- längere Lagerung bei 4°C

2.3.2 Verwendete Antikörper und Kontrollen

Da keine P-Glycoprotein-Antikörper zur Verfügung standen, die vom Hersteller garantiert auch gegen Rind gerichtet sind, wurden zunächst 3 verschiedene Produkte (P-Glycoprotein [JSB-1], Abcam; Anti-P-Glycoprotein Mouse mAb [C219], Calbiochem; Anti-P-Glycoprotein Mouse mAb [C494], Calbiochem) in einer immunhistochemischen Untersuchung nach ABC-Methode an bekanntermaßen P-gp exprimierendem Hoden von Mensch sowie am Rind in unterschiedlicher Fixation getestet. Da lediglich Anti-P-Glycoprotein Mouse mAb [C494] beim Rind Signale zeigte, wurde dieser im Weiteren für Immunfluoreszenzuntersuchungen verwendet:

Tab. 8. : Daten des Primärantikörpers

Antikörper	Herkunft	Hersteller	Verdünnung
Anti-P-Glycoprotein Mouse mAb [C494]	Maus	Calbiochem	1:20

Für die Kontrollen wurde der Primärantikörper durch die Mischung PBS 1x / 1% BSA ersetzt.

Tab. 9. : Daten des Sekundärantikörpers

Antikörper	Herkunft	Hersteller	Verdünnung
Alexa 488 anti-Mouse	Esel	Invitrogen	1:2000

2.3.3 Auswertung und Dokumentation

Die Auswertung wurde an einem Axiovert 200M Mikroskop der Firma Zeiss mit einer AxiocamMR3 Kamera vorgenommen. Das Axiovision Programm von Zeiss diente der Aufnahme und Digitalisierung der Bilder. Eine Bearbeitung erfolgte mit Adobe Photoshop.

2.4 Rhodamin-Assay: Analyse der Funktionalität von MDR-1 in BCEC-1 mittels FACS

Die fluoreszenzaktivierte Zellanalyse (fluorescence activated cell sorting = FACS) wird zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen verwendet. Meist wird eine Antigen-Antikörper-Reaktion ausgenutzt, bei der Fluoreszenzfarbstoff-markierte Antikörper zum Einsatz kommen. Es ist jedoch auch möglich, wie in kommerziellen Tests, einen aufgrund seiner Lipophilie in die Zelle diffundierenden, fluoreszierenden Stoff als Farbgeber zu verwenden und dessen Efflux durch bestimmte Inhibitoren zu hemmen.

Als Messprinzip dient bei der FACS-Analyse die Methode der hydrodynamischen Fokussierung (Abb.6). Hierbei werden fluoreszenzgefärbte Partikel vereinzelt und nacheinander an einer Lichtquelle vorbeigeschleust. Pressluft bringt die Partikel über eine Kapillare, in der ein laminarer Hüllstrom aus entgastem Wasser für die Zentrierung der Partikel sorgt, mit hoher Geschwindigkeit in die Probenkammer. Der

Fluoreszenzfarbstoff wird durch Laser angeregt und emittiert ein Lichtsignal. Dieses Signal verhält sich proportional zur stöchiometrisch gebundenen oder enthaltenen Fluorochrommenge. Es wird in einem Photomultiplier verstärkt und in ein elektrisches Signal umgewandelt. Die Durchflussrate (Partikel/ Zeit) wird über die eingehenden Signale berechnet und digital angezeigt. Histogramme oder Punktwolken dienen der Visualisierung.

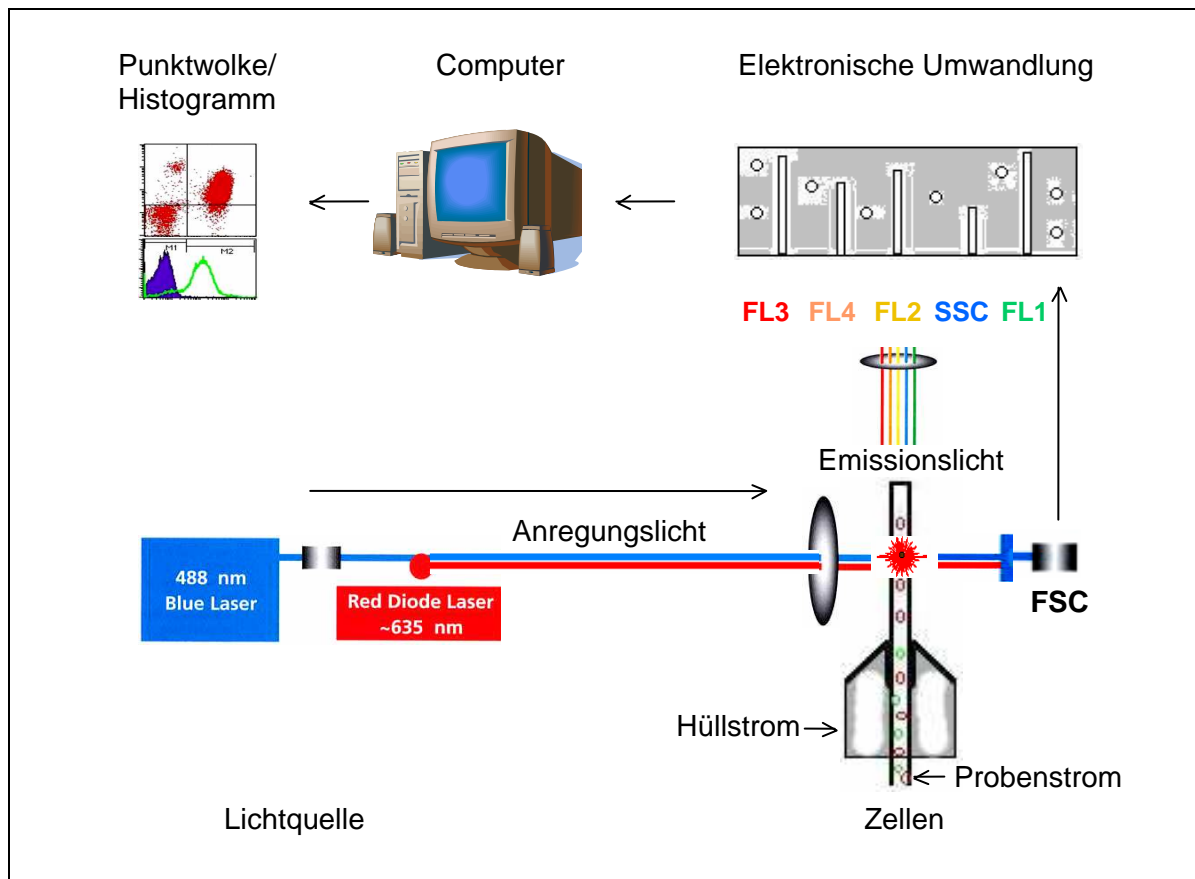


Abb. 6: Darstellung des FACS-Prinzips.

(zur Verfügung gestellt von Dr. Nelli Baal, Zentrum für Frauenheilkunde & Geburtshilfe des Universitätsklinikums Gießen und Marburg)

2.4.1 Protokoll für den Rhodamin-Assay

Rhodamin123 ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der für funktionelle Analysen von MDR-Proteinen genutzt wird. Es handelt sich um einen lipophilen Stoff, der per diffusionem in die Zelle eindringt und vor allem über P-Glycoprotein wieder hinaus transportiert wird. Er hat ein Molekulargewicht von 380,82 g/mol.

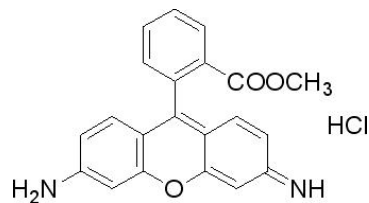


Abb. 7: Strukturformel von Rhodamin123.

Um jedoch eine Beteiligung von MRP-1, einem weiteren ABC-Transporter, am Efflux des Farbstoffes ausschließen zu können, müssen Substrate von P-gp als Inhibitoren eingesetzt werden. Ein klassischer Inhibitor der ersten Generation ist Verapamil. Ein neuerer Inhibitor der zweiten Generation ist PSC833.

Zellen wurden in 6-Wellplatten kultiviert bis sie konfluent waren. Für jede Probe wurden zwei Wells verwendet. Am Tag des Versuches wurden die Puffer frisch angesetzt:

DMSO (0,125%) - Puffer 100 ml

Hanks' (with Ca & Mg/ without Phenolred)	99,875 ml
DMSO 100%	125 µl

Verapamil - Stammlösung 400 µM

Verapamil (491,06 M)	1,96 mg
DMSO (0,125%)-Puffer	10 ml

PSC833 – Stocklösung 5 mM in 69,7% DMSO

PSC833	1,811 mg
DMSO (100%)	208 µl
Wasser	90,19 µl

PSC833-Stammlösung (100 µM)

PSC833-Stocklösung (5 mM)	140 µl
DMSO (0,125%)-Puffer	6,86 ml

Tab. 10. : Rhodamin (30 µM) - Verapamil Verdünnungen

c(Verapamil) Stoff/Puffer	200 µM	50 µM	12,5 µM	3,125 µM	0,78 µM
Verapamil-Stammlösung 400 µM	3,5 ml	875 µl	218,8 µl	54,69 µl	13,65 µl
Hanks' (with Ca & Mg/ without Phenolred)	3,5 ml	6,115 ml	6,771 ml	6,935 ml	6,976 ml
Rhodamin-Stammlösung (20 mM)	10,2 µl	10,2 µl	10,2 µl	10,2 µl	10,2 µl

Rhodamin (30 µM) - PSC833 (8 µM)

PSC833 (100 µM)	320 µl
Rhodamin-Stammlösung (20 mM)	6 µl
Hanks' (with Ca & Mg/ without Phenolred)	3,674 ml

Rhodamin (30 µM)

DMSO (0,125%)-Puffer	3,5 ml
Hanks' (with Ca & Mg/ without Phenolred)	3,5 ml
Rhodamin-Stammlösung (20 mM)	10,2 µl

Tab. 11. : Verapamil - DMSO-Puffer

c(Verapamil) Stoff/Puffer	200 µM	50 µM	12,5 µM	3,125 µM	0,78 µM
Verapamil-Stammlösung 400 µM	3,5 ml	875 µl	218,8 µl	54,69 µl	13,65 µl
DMSO (0,125%)-Puffer	3,5 ml	6,125 ml	6,781 ml	6,945 ml	6,986 ml

PSC833 (8 µM) – DMSO-Puffer

PSC833 (100 µM)	560 µl
DMSO (0,125%)-Puffer	6,440 ml

Tab. 12. : Verapamil - Hanks'

c(Verapamil) Stoff/Puffer	200 µM	50 µM	12,5 µM	3,125 µM	0,78 µM
Verapamil-Stammlösung 400 µM	17,5 ml	4,25 ml	1,062 ml	265,6 µl	66,3 µl
Hanks' (with Ca & Mg/ without Phenolred)	17,5 ml	29,75 ml	32,938 ml	33,734 ml	33,934 ml

PSC833 (8 µM) - Hanks'

PSC833 (100 µM)	2,72 ml
Hanks' (with Ca & Mg/ without Phenolred)	31,28 ml

DMSO (0,0625%) - Waschpuffer

DMSO (0,125%)-Puffer	20 ml
Hanks' (with Ca & Mg/ without Phenolred)	20 ml

Tab. 13. : Trypsin (2x) - Verapamil

c(Verapamil)	200 µM	50 µM	12,5 µM	3,125 µM	0,78 µM
Stoff/Puffer					
Verapamil-Stammlösung 400 µM	3,29 mg*	875 µl	218,75 µl	54,69 µl	13,65 µl
Trypsin 10x	1,4 ml	1,4 ml	1,4 ml	1,4 ml	1,4 ml
PEM	5,6 ml	4,725 ml	5,381 ml	5,545 ml	5,586 ml

* Das nötige Volumen der Verapamil-Stammlösung wäre zu groß gewesen, so dass das Verhältnis von PEM zu Trypsin nicht mehr gestimmt hätte. Daher wurde für die hohen Konzentrationen der Feststoff hinzugegeben.

Trypsin (2x) - PSC833 (8 µM)

PSC833 (100 µM)	560 µl
Trypsin 10x	1,4 ml
PEM	5,04 ml

Trypsin 2x

Trypsin 10x	1,4 ml
PEM	5,6 ml

Tab. 14. : PBS-Waschlösung mit Verapamil

c(Verapamil)	200 µM	50 µM	12,5 µM	3,125 µM	0,78 µM
Stoff/Puffer					
Verapamil-Stammlösung 400 µM	8,18 mg*	3,25 ml	812,5 µl	203,13 µl	50,7 µl
PBS 1x	26 ml	22,75 ml	25,188 ml	25,797 ml	25,949 ml

* Das nötige Volumen der Verapamil-Stammlösung wäre zu groß gewesen, so dass das Verhältnis von PBS zu dem Verapamil-Puffer nicht mehr gestimmt hätte. Daher wurde für die hohen Konzentrationen der Feststoff hinzugegeben.

PBS-Waschlösung mit PSC833 (8 μ M)

PSC833 (100 μ M)	2,72 ml
PBS 1x	31,28 ml

Zunächst wurde das Kulturmedium aus den Wellplatten entfernt. Anschließend folgte eine zweimalige Waschung mit 1,5 ml Hanks' with Ca & Mg without Phenolred pro Well.

Je zwei Wells wurden mit 1,5 ml derselben Verdünnung des Inhibitor-DMSO-Puffers für 60 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, während die Kontrollen lediglich mit DMSO (0,125%)-Puffer unter den selben Konditionen behandelt wurden.

Nach Ablauf der Inkubationszeit konnte der Puffer abgesaugt und durch 1,5 ml der entsprechenden Rhodamin (30 μ M)-Inhibitor Verdünnung ersetzt werden. Die Nullkontrolle (Zellen, die weder mit Blocker noch mit Rhodamin behandelt wurden) inkubierten mit DMSO (0,0625%)-Waschpuffer. Dahingegen erhielt die Rhodamin-Kontrolle (Zellen, die nur mit Rhodamin beladen, nicht jedoch geblockt wurden) den Rhodamin (30 μ M)-Puffer. Kontroll-Zellen, die einzig mit den Hemmstoff-Verdünnungen behandelt werden sollten, inkubierten in dieser Zeit mit Inhibitor-Hanks'-Puffer. Auf diese Weise war gewährleistet, dass alle Zellen in diesem Schritt mit derselben DMSO-Konzentration (0,0625%) behandelt wurden. Die Inkubationsdauer betrug 60 min bei 37°C und 5% CO₂.

Auf ein Absaugen der Lösungen folgte eine zweimalige Waschung der Wells mit je 1 ml Hemmstoff-Hanks'-Verdünnung. Die Rhodamin- und die Null-Kontrollen wurden mit DMSO (0,0625%)-Waschpuffer behandelt.

5 ml dieser Puffer wurden im Folgenden für 60 min in die Wells pipettiert, um einen möglichen Efflux zu gewährleisten.

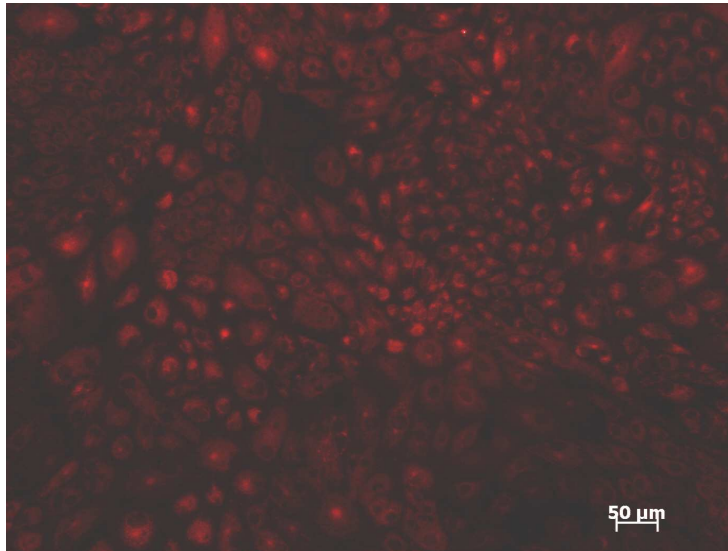


Abb. 8: BCEC-1 nach 60 min Behandlung mit 50 μ M Verapamil und 30 μ M Rhodamin.

Die nächste Waschung wurde mit 1,5 ml Hanks' without Ca & Mg vorgenommen, um danach eine Trypsinierung von 12 min mit 1,5 ml der passenden Trypsin (2x)-Inhibitor-Puffer durchzuführen. Die Kontroll-Wells wurden mit reinem Trypsin (2x) behandelt. Abgestoppt wurde mit 5,5 ml der PBS-Waschlösungen mit Hemmstoff, sobald sich die Zellen abgelöst hatten. Für die ungeblockten Kontrollen wurde reines PBS ohne Blocker verwendet. In einem 5 minütigen Zentrifugationsschritt bei 900 U/min wurden die Zellen pelletiert. Nach dem Entfernen des Überstandes mussten die Zellen entsprechend ihrer Zahl in 500-800 μ l PBS (1x) aufgenommen, in FACS-Röhrchen überführt und bis zur Analyse auf Eis aufbewahrt werden.

Eingesetzte Inhibitor-Konzentrationen und Kontrollen für den Rhodamin-Assay

Verapamil wurde in den Konzentrationen 200 μ M, 50 μ M, 12,5 μ M, 3,125 μ M und 0,78 μ M eingesetzt. PSC833 (freundlicherweise von Novartis Pharma GmbH, Nürnberg zur Verfügung gestellt) diente aufgrund seiner höheren Spezifität lediglich als Kontroll-Substanz und wurde daher nur als 8 μ M Lösung angewandt.

Als Nullkontrolle wurden bei jedem Versuch Zellen verwendet, die weder Kontakt zu Rhodamin noch zu einem Inhibitor hatten.

Als weitere Kontrollen wurden Zellen verwendet die entweder nur mit Rhodamin oder nur mit der jeweiligen Verdünnung des Inhibitors inkubiert wurden.

2.4.2 Auswertung und Dokumentation

Unmittelbar vor der Analyse durch ein FACS Calibur-Gerät und die CellQuestPro-Software (Becton Dickinson) mussten die Zellen mit einem Vortexgerät durchgemischt werden, um ein Verklumpen der Zellen zu verhindern.

Die erste Probe waren stets die nicht-fluoreszierenden, nicht inhibierten Zellen (Abb. 9). Alle Ergebnisse wurden als Punktwolken-Diagramme dargestellt.

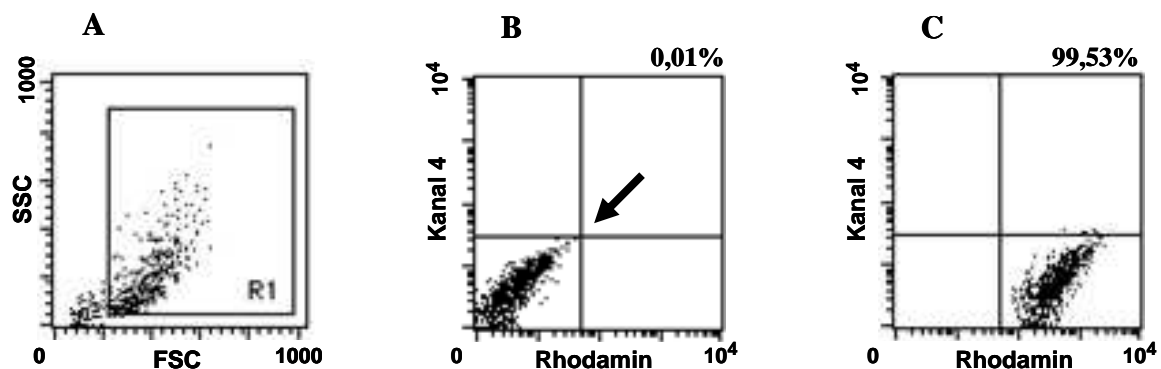


Abb. 9: FACS-Analyse von BCEC-1 Zellen nach Rhodamin-Assay.

Als nicht fluoreszierende Referenzgröße für nachfolgende Proben wurden die unbehandelten Zellen mit Region 1 (R1) eingegrenzt (A). SSC repräsentiert das Seitwärtsstreulicht als Maß für die Zellkerngröße, FSC ist das Vorwärtsstreulicht und beschreibt die Zellgröße und Granularität der untersuchten Zellart. (B) zeigt die Einstellung der Position des Quadrantenkreuzes (Pfeil) und damit die Normierung auf diese Art der Zellen. Für alle weiteren Proben wurde diese Einstellung übernommen. Analysiert wurden nachfolgend u.a. sowohl mit Rhodamin 30 μ M inkubierte als auch mit 12,5 μ M Verapamil inhibierte Zellen (C). Aufgrund der Rechtsverschiebung Rhodamin-haltiger Zellen entlang der x-Achse umfasst der rechte untere Quadrant stets durch Rhodamin fluoreszierende BCEC-1 nach Inhibition des Effluxes. Prozentangaben beziehen sich auf diesen Anteil der Zellen.

2.5 Transportassay: Analyse der Funktionalität von MDR-1 in BCEC-1 mittels ^3H -Digoxin

Da Transport in polarisierten Zellen grundsätzlich in zwei Richtungen, nach apikal oder nach basal denkbar ist und im Rahmen einer Trächtigkeit zusätzlich zwei Kompartimente miteinander in Wechselwirkung treten, wurde für den Versuchsaufbau ein Transwell-System gewählt (siehe Abb. 5). Hier kann ein Substrat in ein einzelnes Abteil appliziert werden. Eine semipermeable Membran mit 0,4 μm großen Poren, auf welcher eine nachweisbar dichte Monoschicht kultiviert ist, ermöglicht bei aktivem Transport durch die Zelle einen Übertritt des Substrates von einem Kompartiment ins andere. Auf diese Weise wird ein möglicher Transport in materno-fetaler oder feto-maternaler Richtung simuliert.

Die Dichtigkeit der Zellschicht lässt sich mikroskopisch nur ungenau prüfen: Lediglich augenscheinliche Löcher können zum Ausschluss einer Kulturfläche für den Versuch führen. Um genauer beurteilen zu können, ob eine Schicht intakt ist, wird ein sogenanntes TEER-Messgerät (transepithelial electrical resistance) verwendet. Die Zellen bauen einen messbaren Widerstand zwischen dem basalen und apikalen Kompartiment auf. Ab einem Wert von 200 Ω geht man von Intaktheit der Zellschicht aus. Verwendet wurde ein Epithelial Voltohmmeter (EVOM) mit einer STX2-Elektrode (WPI Inc., Berlin, Germany).

2.5.1 Protokoll für die Transportmessungen

Die BCEC-1 wurden wie unter 2.1.1 beschrieben in Inserts kultiviert. Waren in der mikroskopischen Kontrolle nahezu keine zellfreien Flächen mehr zu sehen, so wurden die Zellen über Nacht im Institut für Pharmakologie und Toxikologie inkubiert, um dort am folgenden Tag einer Transportmessung in den entsprechend gesicherten Räumlichkeiten unterzogen zu werden.

Am Tag der Messung wurde zunächst der transepitheliale elektrische Widerstand mittels des EVOM-Gerätes gemessen: Die Elektrode war zuvor mit Hilfe von 0,1 M KCl kalibriert, in 70% Ethanol desinfiziert und in Medium äquilibriert worden. Um den Widerstand zu ermitteln, wurde die Elektrode mit dem kürzeren Ende in das Medium des Inserts und mit dem längeren in das Medium des Wells gehalten. Dieser Vorgang wurde pro Well zweimalig durchgeführt. Inserts ohne Zellen dienten dabei der Ermittlung des Nullwertes. Zeigten die TEER-Werte sich als ausreichend hoch

(deutlich über 200 Ω) und waren keine freien Flächen zu beobachten, so wurden die Puffer angesetzt:

Tab. 15. : Transportpuffer: Substanzen für 250 ml

C_{soll} in mM	NaCl	KCl	MgSO₄ x 7H₂O	KH₂PO₄	Hepes	CaCl₂	Glucose	Aqua dest.
	142,9	4,7	1,2	1,2	20	1,8	10	
V_{Stocklösung} M_{Feststoff}	2,09 g	5,875 ml	3 ml	1,5 ml	50 ml	2,25ml	0,4504 g	ad 250 ml

Tab. 16. : Pipettierschema Digoxin kalt

c(Digoxin)	200 μM	100 μM	50 μM
Stoff/Puffer			
Digoxin (780,94 g/mol)	0,625 mg	0,312 mg	0,156 mg
DMS 100%	400 μ l	2000 μ l	2000 μ l
Transportpuffer	3600 μ l	2000 μ l	2000 μ l

Tab. 17. : Pipettierschema für die Testflüssigkeit (markiertes Digoxin)

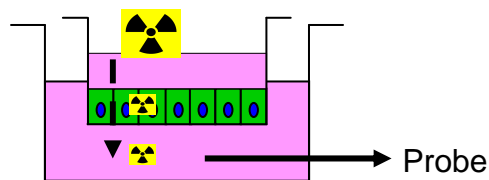
c(Digoxin)	10 μM 0,5% heiß	1 μM 5% heiß	0,1 μM 30% heiß	0,01 μM 100% heiß
Stoff/Puffer				
Digoxin kalt	398 μ l (Digoxin 200 μ M)	76 μ l (Digoxin 100 μ M)	11,2 μ l (Digoxin 50 μ M)	-
Transportpuffer	Ad 8000 μ l	Ad 8000 μ l	Ad 8000 μ l	Ad 8000 μ l
Abzudampfendes ³[H]-Digoxin	6,8 μ l	6,8 μ l	4,08 μ l	1,36 μ l

Die Inserts und die dazugehörigen Wells wurden zweimalig in Transportpuffer gewaschen und die Flüssigkeit restlos abgesaugt. Für eine Messung des Fluxes von apikal nach basal wurden die Wells mit je 800 μ l Transportpuffer befüllt und die Inserts mit 400 μ l der Testflüssigkeit. Für Messungen in die entgegengesetzte Richtung erhielten die Inserts 400 μ l Transportpuffer und die Wells 800 μ l Testflüssigkeit.

Die Testflüssigkeit setzte sich aus Transportpuffer mit ^3H -markiertem (heißem) Digoxin und unmarkiertem, in DMSO-gelösten Digoxin zusammen. Radioaktiv-markiertes Digoxin wurde hierfür zunächst mit N_2 abgedampft. In verschiedenen Versuchen erreichte die Testflüssigkeit so Digoxin-Konzentrationen von 10 nM, 100 nM, 1 μM , 10 μM . Der prozentuale Anteil des Tritium-markierten Digoxins variierte je nach angestrebter Gesamt-Konzentration.

Die Probenentnahme richtete sich nach der Fluxrichtung: Von apikal nach basal wurden je 40 μl Flüssigkeit aus dem Well entnommen. Von basal nach apikal bestand die Probe aus 20 μl Flüssigkeit des Inserts.

von apikal nach basal



von basal nach apikal

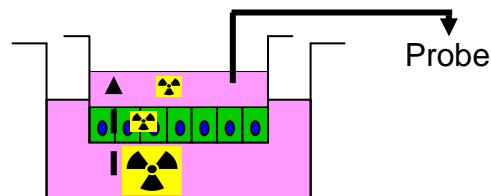


Abb. 10: Versuchsaufbau der Transportmessung.

Probenentnahmen erfolgten nach 5, 30, 60 und 90 Minuten. Während der gesamten Messung wurden die Well-Platten auf einer Aluminiumplattform auf ungefähr 37°C temperiert.

Die Proben wurden in Probengefäßen mit je 2 ml Szintillationsflüssigkeit, die sich aus 300 ml Isopropanol, 300 ml Aqua bidest. und 6000 ml Rotiszint eco plus® zusammensetzt, vermischt und im Flüssigkeits-Szintillationszähler gemessen.

2.5.2 Protokoll für die Blockierung des Digoxin-Transportes

Im Falle einer Blockierung des Transportes wurden dem in 2.5.1 beschriebenen Protokoll folgende Schritte vorgeschoben:

Das Medium wurde aus Insert und Well entfernt und beides zweimalig mit Hanks' with Ca & Mg/ without Phenolred gewaschen. Es wurde aus Puffer und Verapamil eine Lösung hergestellt, in welcher die zu blockierenden Zellen 90 Minuten vorinkubiert wurden (Tab. 18).

Verapamil Stammlösung (400 µM)

Verapamil (491,06 g/mol)	4,32 mg
Hanks' (with Ca & Mg/ without Phenolred)	22 ml

Tab. 18. : Pipettierschema Verapamil-Vorinkubation

c(Verapamil)	
Stoff/Puffer	250 µM
Verapamil Stammlösung	7,5 ml
Hanks' (with Ca & Mg/ without Phenolred)	4,5 ml

Kontroll-Wells in gleicher Anzahl, die der Transportmessung unblockiert zugeführt wurden, erhielten nur Puffer.

Für die Messung wurde Transportpuffer mit der entsprechenden Verapamil-Konzentration (Tab. 21) hergestellt, sowie ein Transportpuffer mit der gewünschten Digoxin-Konzentration (Tab. 19) und einer, der beides enthielt (Tab. 20).

Digoxin Stammlösung (400 nM; 35% heiß)

³ [H]-Digoxin (heiß)	5,714 µl
Transportpuffer	2,389 ml
Digoxin kalt (50 µM) (s. Tab. 16)	12,48 µl

Tab. 19. : Pipettierschema Digoxin-Testlösung

c(Digoxin)	
Stoff/Puffer	0,1 µM 35% heiß
Digoxin Stammlösung	1250 µl (Stammlsg. 400 nM)
Transportpuffer	3800 µl

Tab. 20. : Pipettierschema Digoxin-Verapamil-Testlösung

c(Digoxin)_c(Verapamil)	0,1 μM_250 μM 35% heiß
Stoff/Puffer	
Digoxin Stammlösung	1250 μ l (Stammlsg. 400 nM)
Transportpuffer	625 μ l
Verapamil Stammlösung	3125 μ l

Tab. 21. : Pipettierschema Verapamil-Transportpuffer

c(Verapamil)	250 μM
Stoff/Puffer	
Verapamil Stammlösung	62,5 ml
Transportpuffer	37,5 ml

Nicht zu blockierende Zellen wurden wie üblich (2.5.1) behandelt. Zu blockierende Zellen wurden statt in reinem Puffer in der Puffer-Verapamil-Lösung und dem Digoxin-Verapamil-Puffer inkubiert.

Im Weiteren wurde verfahren wie unter (2.5.1) angegeben.

2.5.3 In der Transportmessung eingesetzte Konzentrationen

Für Versuche ohne Blockierung wurden Digoxin-Konzentrationen von 10 nM (100% radioaktiv), 100 nM (30% radioaktiv), 1 μ M (5% radioaktiv) und 10 μ M (0,5% radioaktiv) verwendet.

Inhibitions-Versuche fanden in der Kombination 100 nM Digoxin (35% radioaktiv) mit 250 μ M Verapamil statt.

2.5.4 Dokumentation und Auswertung

Die Ergebnisse in dpm (disintegrations per minute) wurden mit Microsoft Excel in fmol/ well umgerechnet. Für jede Probe wurde mit Hilfe des Programms die Steigung des Fluxes während des Messzeitraumes ermittelt. Die Steigungen derselben

Richtung und Konzentration wurden mit Hilfe von GraphPad Prism gemittelt und die Standardabweichung des Mittelwertes errechnet.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der RT-PCR

Mit Hilfe der RT-PCR konnte die spezifische mRNA der drei Transporter MRP1 (336 bp), BCRP (639 bp) und MDR1 (682 bp) in BCEC-1 Zellen nachgewiesen werden. Auch in manuell getrenntem, plazentarem Gewebe waren die entsprechenden Signale zu beobachten.

Lediglich OATP1A2 war weder in BCEC-1 noch im Gewebe detektierbar.

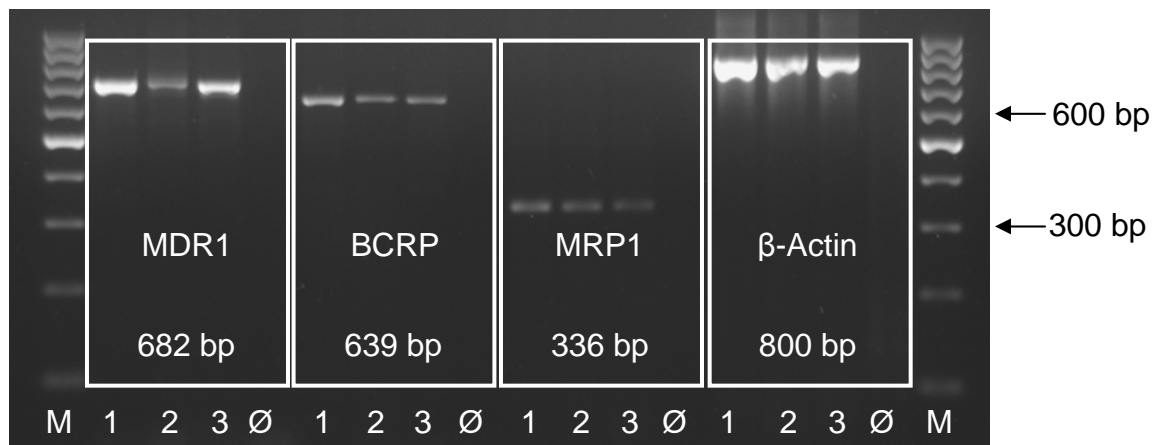


Abb. 11: Nachweis spezifischer mRNA-Amplifikate von ABC-Transportern (MDR1, BCRP, MRP1) in BCEC-1 (1), manuell separiertem Karunkel- (2) und Kotyledonengewebe (3) mittels RT-PCR.

Ø stellt die Nullkontrolle ohne cDNA dar, M den eingesetzten 100 bp Marker

Die Banden wurden herauspräpariert und sowohl in 3'- als auch in 5'-Richtung kommerziell sequenziert. Die Ergebnisse dieser Sequenzierungen bestätigten die Spezifität der Amplifikate. Ein Vergleich der erhaltenen Daten mit Referenzsequenzen der NCBI-Datenbank ergab für BCRP 99% Übereinstimmung mit NM_001037478, für MRP1 99% Übereinstimmung mit NM_174223 und für MDR1 Übereinstimmung mit XM_590317.

662 bp des MDR1-Amplifikats konnten identifiziert und dem Eintrag mit 99% Deckungsgleichheit zugeordnet werden. Lediglich das vorhergesagte Cytosin an Position 3183 der in NCBI eingetragenen vorhergesagten Sequenz stellte sich in der

Sequenzierung als Thymin dar. Für die gefundene Sequenz wurde ein Eintrag unter der Nummer „EU599188“ [gi:185178487] (Waterkotte, B., Doering, B., Hambruch, N., Geyer, J., Pfarrer, C. 2008) mit folgender Basenabfolge vorgenommen:

```
1  ttctcctat gctggctgtt tccggttgg tgctacttg gtggcacaag gcatcatgga
61  gtttcaggat gttctcttag tgttctcagc tattgtcttt ggtgccatgg ctgtgggaca
121 ggtcagttca ttgctcctg actatgccaa ggccaaagtg tcagcagccc acgtcatcaa
181 tatcattgaa aaaattcctc tgatcgacag ctacagcaca gaaggcctaa agccgagtac
241 agtggaagga aatgtggcat ttaatgacgt cgtgttcaac taccctactc gaccagacat
301 cccggtgctt cgggggctga gcctggaggt gaagaagggc cagacgctgg ccctggtggg
361 cagcagcggc tgcgggaaga gcacagtcgt ccagctcctg gagcgggttct atgaccctt
421 ggctggcaca gtgttaatcg atggcaagga aataaagcag ctgaatgtcc agtggctgcg
481 tgcacacatg ggcatcgtgt cccaggagcc cattctgttt gactgcagca tcggcgagaa
541 catgcctac ggagacaaca gccgggtcgt gtccaggag gagattgagc gcgcggccaa
601 ggaggccaac atccaccctc tcatcgagat gctgccagac aaatacaaca ccagagtagg
661  gg
```

3.2 Ergebnisse der Immunfluoreszenz

Mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers unter schonender Permeabilisierung durch Digitonin konnte P-Glycoprotein in BCEC-1 detektiert werden. Indem verschiedene Fokusebenen durch die spiegeleiförmige Zelle angelegt wurden, konnte die Lokalisation der Fluoreszenzsignale dem Plasmalemm zugeordnet werden. Dabei nahm die Intensität der Färbung von basal nach apikal zu (Abb. 12). Je weiter nach apikal die Fokusebene verschoben wurde, desto weniger Zytoplasma umgab den Zellkern. Auf diese Weise erschien die durch P-Glycoprotein erzeugte Fluoreszenz wie ein Randsaum um den blau-gefärbten Kern.

Die Negativkontrolle, in der der Primärantikörper durch Puffer ersetzt wurde, wies keinerlei grüne Fluoreszenz auf.

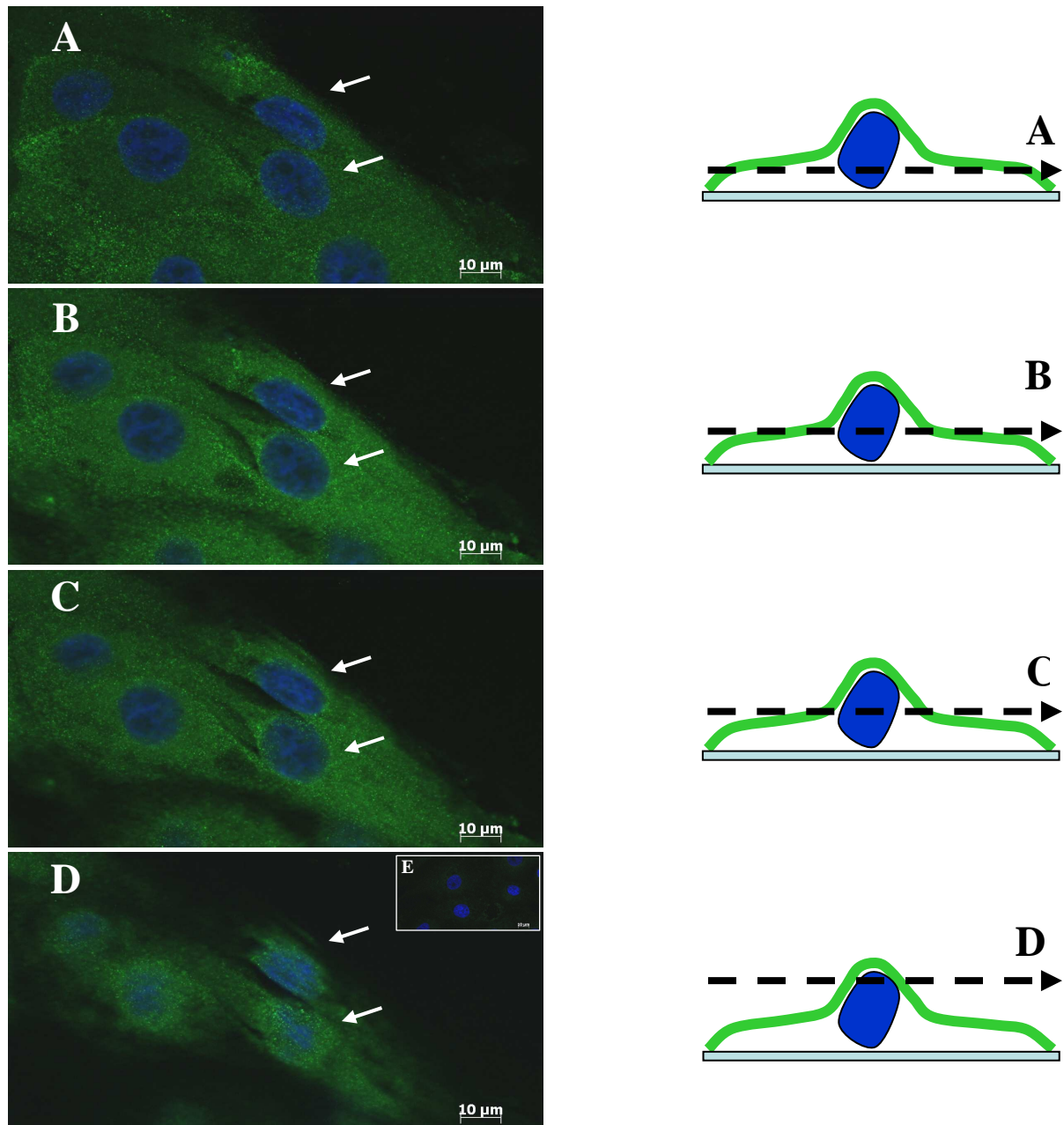


Abb. 12: Detektion von P-Glycoprotein (grün) in BCEC-1-Kulturen.

Links Schnittbilder durch eine Kolonie immunzytochemisch-gefärbter BCEC-1 (A-D). *E* (Inset) Negativkontrolle; der Primärantikörper wurde ersetzt durch PBS-BSA. *Rechts* Darstellung der jeweils getroffenen Ebene durch die links mit *Pfeilen* gekennzeichneten Zellen (*blau* Kern; *grün* mit Alexa 488 detektierter mAb C494 Antikörper; *schwarze Linie* Schnittebene)

3.3 Ergebnisse des Rhodamin-Assays

Der Rhodamin-Assay wurde durchgeführt, um die Funktionalität des P-Glycoproteins in BCEC-1 nachzuweisen. Inhibitoren des Transporters sollten den Efflux des P-gp-Substrates Rhodamin123 verhindern und somit einen im FACS darstellbaren Anstieg der intrazellulären Fluoreszenz provozieren (Abb. 8; Abb. 9; Abb. 13).

Verapamil in verschiedenen Konzentrationen (200 μ M, 50 μ M, 12,5 μ M, 3,125 μ M und 0,78 μ M) sowie PSC833 (8 μ M) dienten dabei als Hemmstoffe.

Eine nahezu vollständige Blockade wurde mit PSC833 (Abb. 13, D) und Verapamil 200 μ M, 50 μ M und 12,5 μ M (Abb. 13, B) erzielt. Im Mittel fluoreszierten 98,2% der mit 200 μ M Verapamil blockierten, 99,5% der mit 50 μ M und 99,4% der mit 12,5 μ M Verapamil behandelten Zellen. PSC833 (8 μ M) hemmte bei 99,4% der BCEC-1-Zellen den Efflux des Farbstoffes.

Puffer mit 3,125 μ M Verapamil erreichten eine mittlere Inhibition von 55%. Dahingegen stellten sich im Mittel lediglich noch 7,7% der Zellen bei einer Verapamil-Konzentration von 0,78 μ M als blockiert dar (Tab. 22). Eine etwa 50%ige Hemmung (IC 50) wäre folglich im Bereich der 3 μ M zu erwarten.

Tab. 22. : Im Rhodamin-Assay erzielte Inhibition

Inhibitor (Konzentration)	Mittel (n=3) der blockierten Zellen in %
Verapamil (200 μ M)	98,2 \pm 0,6
Verapamil (50 μ M)	99,5 \pm 0,2
Verapamil (12,5 μ M)	99,4 \pm 0,4
Verapamil (3,125 μ M)	55,0 \pm 10,3
Verapamil (0,78 μ M)	7,7 \pm 6,5
PSC833 (8 μ M)	99,4 \pm 0,1

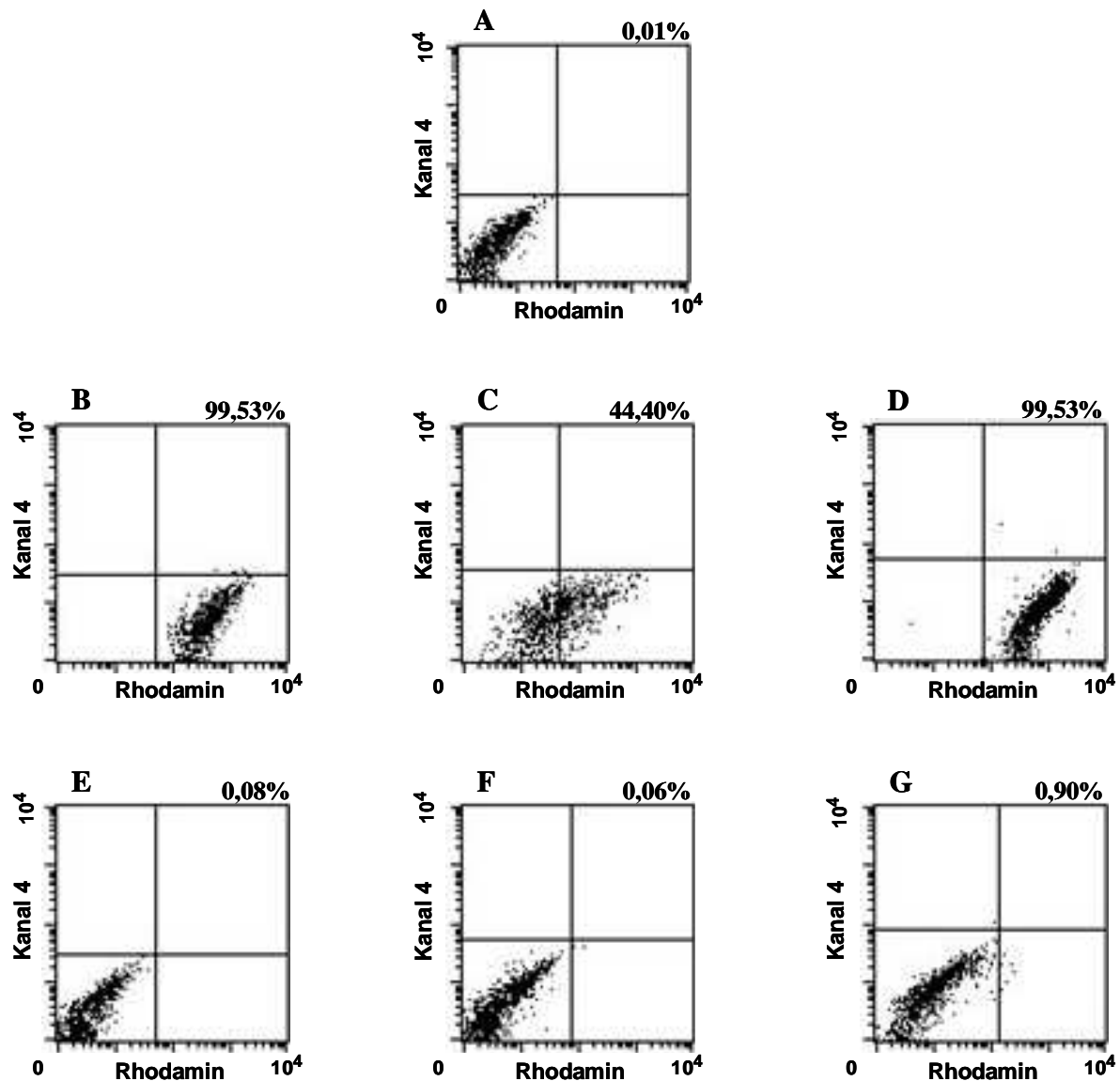


Abb. 13: FACS-Analyse von BCEC-1 Zellen nach Rhodamin-Assay.

Als Referenzgröße wurden nicht fluoreszierende, unbehandelte Zellen verwendet (A). Bei 99,53% der Zellen, die mit $30\mu\text{M}$ Rhodamin inkubiert wurden, konnte durch Einsatz von $12,5\mu\text{M}$ Verapamil der Rhodamin-Efflux inhibiert werden (B), erkennbar durch die Rechts-Verschiebung der Dotplot-Wolke entlang der X-Achse (Rhodamin-Fluoreszenz). Die Inkubation mit $3,125\mu\text{M}$ Verapamil führte zu einer Inhibition von 44,40% (C). PSC833 ($8\mu\text{M}$) inhibierte ebenfalls 99,53% der Rhodamin-beladenen Zellen (D). Die Kontrollen E (nur mit Verapamil inkubiert) und F (nur mit PSC833 inkubiert) und Inkubation nur mit $30\mu\text{M}$ Rhodamin (G) zeigten ein ähnliches Erscheinungsbild wie die unbehandelten Zellen in A.

Prozentangaben beziehen sich auf den unteren rechten Quadranten

3.4 Ergebnisse des Transport-Assays

3.4.1 TEER-Messungen

Die Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER) diente der Überprüfung der Geschlossenheit des Monolayers. Voraussetzung für mikroskopisch intakte Kulturen und gute TEER-Werte war die Beschichtung der semipermeablen Membran mit Fibronectin. Der Versuch, die Zellen in unbeschichteten Inserts zu kultivieren, führte, wie schon von Bridger et al. (2007) berichtet, bei verlängerter Wachstumszeit nicht zu lückenlosem Bewuchs durch die Zellen. Zahlreiche Zellen gingen dabei zu Grunde. Daher wurden im weiteren Verlauf alle Inserts vor der Kultivierung mit Fibronectin beschichtet.

Es zeigte sich, dass mit noch mikroskopisch sichtbar unbewachsenen Stellen der TEER-Wert niedrig blieb. Doch auch scheinbar dichte Monolayer erreichten oftmals zunächst relativ niedrige Werte, wenn auch knapp über 200 Ω (Grenzwert), um am darauffolgenden Tag einen deutlichen Anstieg zu erzielen.

Mit steigender Passage, das heißt je häufiger die Zellen subkultiviert und daher älter wurden, desto öfter blieben die TEER-Werte niedrig (Abb. 14). Dies führte zum Ausschluss von Zellen ab Passage 26.

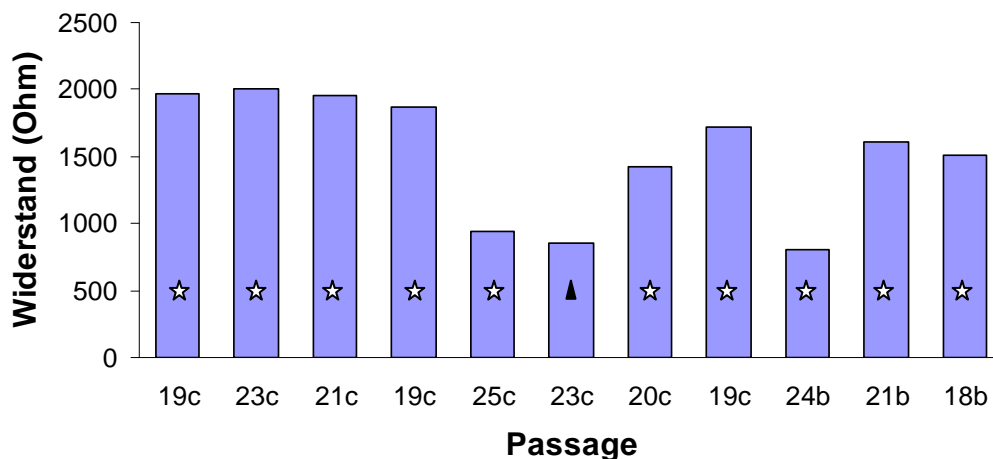


Abb. 14: Mittlere TEER-Werte verwendeter Passagen.

x-Achse: Die Passage (Alter) der Zellen eines Versuchs wird durch Zahlen, die Anzahl der bereits überlebten Kryokonservierungen in Buchstaben von a-c dargestellt. Y-Achse: mittlerer Widerstand aller gemessenen Inserts in Ohm

☆ n = 12; ▲ n = 10

3.4.2 Digoxin-Transport

Um herauszufinden, ob ein gerichteter Substrat-Flux stattfindet, wurde zunächst ein Transport-Assay mit radioaktiv-markiertem Digoxin durchgeführt. Das eingesetzte Transwell-System bietet die Möglichkeit, sowohl den Flux von basal nach apikal (ba) als auch von apikal nach basal (ab) zu testen.

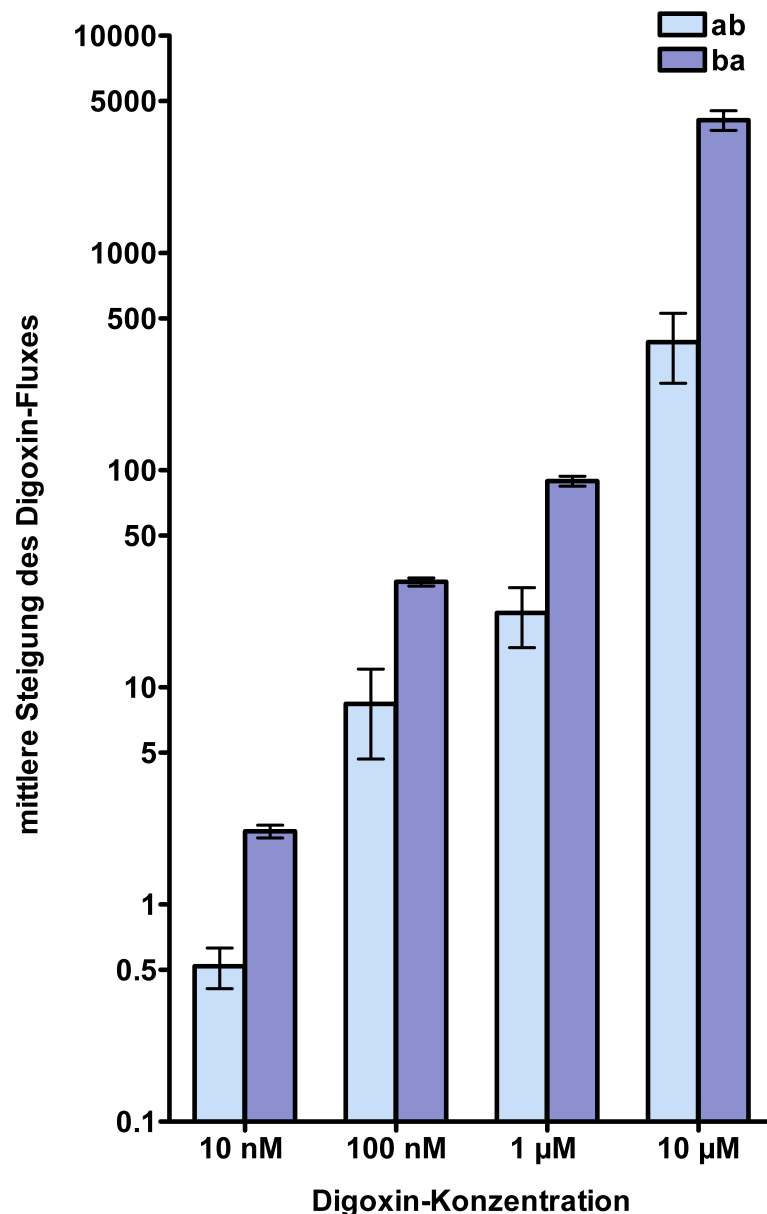


Abb. 15: Mittlere zeitabhängige Steigung des Digoxin-Fluxes.

x-Achse: eingesetzte Digoxin-Konzentrationen; y-Achse: mittlere Steigung des Fluxes während des Messzeitraums von 90 min (logarithmische Skalierung); *hellblau*: Fluxrichtung von apikal nach basal (ab) (mit n = 5 bzw. n = 6 wells (10 µM)) ; *dunkelblau*: Fluxrichtung von basal nach apikal (ba) (mit n = 5 (1 µM) bzw. n = 6 wells)

Zunächst wurde für den Flux eines jeden Wells die Steigung über den gemessenen Zeitraum von 90 min (Messzeitpunkte 5, 30, 60, 90 Minuten) ermittelt. Die Mittelwerte dieser Steigungen mit ihren Standardabweichungen sind in Abbildung 15 zu sehen.

Wie sich in Abbildung 15 zeigt, überwiegt der von basal nach apikal gerichtete Digoxin-Flux stets den der umgekehrten Richtung. Dabei gibt es Schwankungen zwischen den unterschiedlichen Konzentrationen: Bei 10 nM Digoxin überwiegt der Flux von basal nach apikal um etwa das Vierfache, wohingegen bei 10 μ M ein etwa 11fach stärkerer Flux zu beobachten ist.

Mit steigender Konzentration ist gleichzeitig ein höheres Niveau des Fluxes zu sehen. Konzentrationen von 10 nM weisen ein Steigungsniveau von unter fünf auf, während mit 10 μ M Werte von annähernd 5.000 erreicht werden.

Festzuhalten ist, dass der Flux mit Richtung basal nach apikal unabhängig von der eingesetzten Konzentration stärker ist als in umgekehrter Richtung.

3.4.3 Blockierung des Digoxin-Transportes

Die Blockierung des bereits beobachteten Fluxes mit Verapamil sollte Aufschluss über einen tatsächlichen Transport durch P-gp geben. Die Zellen wurden mit Verapamil vorinkubiert und während des Versuches weiter mit Verapamil behandelt.

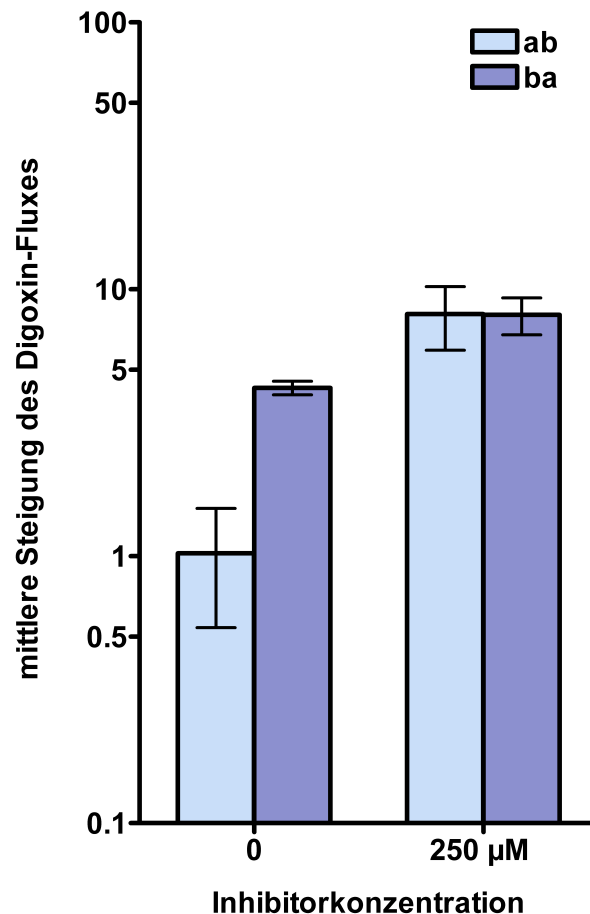


Abb. 16: Mittlere zeitabhängige Steigung des Digoxin-Fluxes mit und ohne Einwirkung eines Inhibitors.

x-Achse: eingesetzte Verapamil-Konzentration; *y-Achse:* mittlere Steigung des Fluxes während des Messzeitraums von 90 min (logarithmische Skalierung); *hellblau:* Fluxrichtung von apikal nach basal (ab); *dunkelblau:* Fluxrichtung von basal nach apikal (ba); n = 6 wells

Wie auch zuvor konnte ohne Einsatz des Inhibitors ein stärkerer Flux von basal nach apikal (ba) beobachtet werden. Bei Einsatz von 250 μ M Verapamil näherten sich der Flux von apikal nach basal (ab) und von basal nach apikal (ba) einander an. Diese Annäherung des normalerweise stärkeren ba-Fluxes an den geringeren ab-Flux kann als Folge eines inhibierten Transportes interpretiert werden. Allerdings ist der Transport beider Richtung unter Verapamil-Inkubation grundsätzlich deutlich höher als der ohne Inhibitor.

4 Diskussion

4.1 Lokalisierung von P-Glycoprotein

In der vorliegenden Arbeit wurde die Zelllinie BCEC-1 auf Expression und Funktionalität von P-Glycoprotein (P-gp), dem Protein des *mdr1*-Gens, untersucht. Dies sollte der Prüfung einer möglichen Nutzung von BCEC-1 als in vitro Modell für plazentaren Transport im Rind dienen. Die Wahl fiel dabei auf P-gp, da seine Relevanz in der Plazenta bereits in anderen Tierarten nachgewiesen ist (Lankas et al. 1998; Smit et al. 1999; Leazer & Klaassen 2003; Pavék et al. 2003) und das Protein außerdem durch sein großes Substratspektrum auch veterinärmedizinisch eingesetzte Arzneimittel abdeckt (Schricks & Fink-Gremmels 2008).

Mit Hilfe einer Immunfluoreszenz-Untersuchung mit Erstellung von Schnittebenen (z-Stapel) durch die BCEC-1-Zelle wurde das Protein der Zellmembran zugeordnet. Die Signale schienen dabei vor allen Dingen apikal lokalisiert zu sein. Diese Beobachtung steht in Einklang mit zahlreichen anderen Arbeiten, in denen P-gp bei epithelialen Zellen in der apikalen Zellmembran lokalisiert wurde, wo es seiner Aufgabe als Efflux-Pumpe nachgeht. Thiebaut et al. wiesen das Protein bereits 1987 in der apikalen Membran zahlreicher humaner Gewebe mittels Immunhistochemie nach. Zwar konnte zu der Zeit mit dem eingesetzten monoklonalen Antikörper MRK16 P-gp nicht in der Plazenta und einigen weiteren Organen nachgewiesen werden, doch wurde auf die Möglichkeit falsch-negativer Ergebnisse aufgrund der Organpräparation hingewiesen (Thiebaut et al. 1987). Im Folgenden detektierten andere Gruppen P-gp auch im Trophoblasten der humanen und murinen Plazenta. Zunächst wurde P-gp mittels Immunhistochemie dem Trophoblasten ohne nähere zelluläre Lokalisation zugeordnet (Cordon-Cardo et al. 1989). Später zeigte man den Effluxtransporter immunhistochemisch in der apikalen Membran des murinen Trophoblasten (Pavék et al. 2003). Mittels Western Blot an Membran-Vesikel-Präparationen der humanen Plazenta wurde bestätigt, dass P-gp zwar apikal, nicht jedoch basal lokalisiert ist (Ushigome et al. (2000).

Somit steht die in der vorliegenden Studie beobachtete vermehrt apikale Lokalisation in Einklang mit bisherigen Ergebnissen.

Es ist zu berücksichtigen, dass alle bislang untersuchten Plazenten hämochorialer Natur waren, weshalb sich die Untersuchungen stets nur auf den fetalen Anteil der

Plazenta bezogen. Dies und die nachweisliche Funktion als Efflux-Pumpe (Hamada & Tsuruo 1988; Horio et al. 1988; Choudhuri & Klaassen 2006) führten dazu, dass man P-gp eine Schutzfunktion für den Fetus zusprach (Kolwankar et al. 2005; Ceckova-Novotna et al. 2006). Der Frage nach einer maternalen Expression von P-gp und seiner Funktion im maternalen Kompartiment ging man nicht nach.

Durch den epitheliochorialen Aufbau der bovinen Plazenta ist eine Berücksichtigung des maternalen Anteils zwingend geboten. Denn nur unter Beachtung des Hin- und Rücktransportes kann entschieden werden, ob und in welchem Ausmaß ein Substrat den Fetus erreicht.

Die Expression von P-Glycoprotein in der apikalen Membran der BCEC-1 spricht für eine Beteiligung dieser Effluxpumpe an der Belieferung des Fetus mit verschiedenen Substraten. Die Ergebnisse der RT-PCR zeigen starke Signale in BCEC-1 und fetalem Gewebe. Das Signal des maternalen Gewebes stellt sich schwächer dar. Da die Plazentome für die Gewebeanalyse manuell separiert wurden, ist die unterschiedliche Stärke der Signale in Karunkel und Kotyledone vorsichtig zu bewerten. In der Literatur wird - in Zusammenhang mit manueller Trennung - von Kontamination des Karunkelgewebes mit Trophoblastzellen (Takahashi et al. 2001) und umgekehrt von Kontamination des Kotyledons mit maternalen Zellen (Bridger et al. 2007) berichtet. Die tatsächliche Stärke der Genexpression ist daher nicht mit dieser Methode zu ermitteln. Zumindest aber geben die Ergebnisse der hier durchgeführten PCR einen deutlichen Hinweis darauf, dass P-gp, vermutlich auch im bovinen Fetus eine Rolle als protektives Effluxsystem ausübt. Seine Existenz in der maternalen Plazenta ist durch die Untersuchung der nachweislich maternalen BCEC-1 bewiesen. Unterschiede in Protein-Expression und funktioneller Aktivität zwischen beiden Kompartimenten bleiben zu klären.

4.2 Beteiligung der drei ABC-Transporter P-gp, MRP1 und BCRP am Rhodamin-Transport

Mittels RT-PCR und anschließender Sequenzierung konnte die mRNA mehrerer ABC-Transporter (MDR1, BCRP, MRP1) in BCEC-1 und bovinen Plazentomen nachgewiesen werden. Bei allen Proben wurde durch reverse Transkription die gleiche Menge RNA in cDNA umgeschrieben und diese bei allen mit gleichem

Volumen für die PCR-Reaktion eingesetzt. Die unterschiedlich stark erscheinenden Signale geben daher unter Umständen Hinweis auf die Bedeutung des jeweiligen Transporters für BCEC-1 und das bovine Plazentom. MDR1 zeigt in BCEC-1 im Vergleich zu den beiden anderen Transportern ein sehr starkes Signal.

Die FACS-Analyse unter Einsatz eines Rhodamin-Assays erwies sich als eine zuverlässige und mit geringen Fehlerquellen behaftete Methode zur Überprüfung der Funktionalität von P-gp in BCEC-1. Durch Einsatz verschiedener Verapamil-Konzentrationen, konnte reproduzierbar sogar ein unterschiedlich starker Efflux des fluoreszierenden Rhodamins beobachtet werden. Das FACS scheint sich daher nicht nur für einen generellen Nachweis der Funktionalität zu eignen, sondern auch für quantitative Analysen.

Zunächst wurde der Rhodamin-Assay ohne FACS durchgeführt, um mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops eine Annäherung an aussagekräftige Stoff-Konzentrationen zu finden. Bei diesen Voruntersuchungen zeigte sich, dass der Beladung der Zellen mit Rhodamin eine Inkubation in Puffer folgen sollte. Diese Phase ermöglichte den nicht inhibierten Zellen einen Efflux, wodurch die störende Abgabe des Farbstoffes während der Analyse im FACS-Gerät verhindert wurde.

Der rasche Efflux aus der BCEC-1 Zelle gebietet ein schnelles Durchführen der letzten Arbeitsschritte und vor allen Dingen der Analyse mittels FACS.

Die Verwendung von Rhodamin und P-gp-Inhibitoren für die MDR-Diagnostik ist keine unbekannte Methode (Chaudhary & Roninson 1991; Hegewisch-Becker et al. 1998; Gaillard et al. 2000; Lorke et al. 2001; Haritova et al. 2007; De Rosa et al. 2008; Schleis et al. 2008). Constable et al. (2006) ließen ihre Zellen ebenfalls zunächst mit dem Inhibitor Verapamil und anschließend mit Rhodamin inkubieren, um P-gp-Aktivität nachzuweisen. Die Arbeitsgruppe wählte eine Detektion im Spektrophotometer.

Da MRP1 ebenfalls auf mRNA-Ebene in BCEC-1 nachweisbar war, muss eine Beteiligung dieses Transporters am Rhodamin-Efflux in Betracht gezogen werden. Zwar ist Rhodamin123 nach Stehfest et al. (2006) kein MRP1-Substrat, doch berichten Minderman et al. (1996), dass Rhodamin123 nicht nur durch P-Glycoprotein, sondern auch durch MRP transportiert wird. Allerdings ergibt die Studie von Minderman eine wesentlich langsamere Transportrate für den MRP-getriebenen Efflux. Außerdem wird nicht weiter klassifiziert, um welchen Vertreter der MRP-Subfamilie es sich handelt. Für die Untersuchung wurden Zellen, die MRP-positiv,

aber P-gp-negativ sind, mit P-gp-positiven verglichen. Nach der Beladung mit Rhodamin123 erhielten die Zellen über unterschiedlich lange Zeiträume in Puffer die Möglichkeit zum Efflux des Substrates. Ab Inkubationszeiten von vier bis hin zu 24 Stunden zeigten auch die P-gp negativen Zellen einen Rhodamin-Efflux. Auf Basis ihrer Daten empfiehlt die Gruppe, für eine allgemeine Multidrug-Resistance-Diagnostik, an der nicht nur P-gp beteiligt ist, Rhodamin123 unter den entsprechenden experimentellen Bedingungen und unter Einsatz eines Breitspektrum-Modulators zu verwenden. Ist aber eine Diagnostik unter Ausschluss einer MRP-Beteiligung gewünscht, so wird der Einsatz von Verapamil oder PSC833 empfohlen.

Der Versuchsaufbau der vorliegenden Arbeit nutzt ein Efflux-Intervall von 60 Minuten. Laut Mindermann (1996) wäre hier noch kein MRP-getriebener Efflux zu erwarten. Zudem sorgt der Einsatz der P-gp-Inhibitoren Verapamil und PSC833 für eine weitere Spezifizierung der beteiligten Transporter. Zwar wird eine geringe Inhibition des MRP1-getriebenen Effluxes von LTC₄, ein weithin bekanntes Substrat für MRP1 (König et al. 1999; Borst & Elferink 2002; Leslie et al. 2005; Choudhuri & Klaassen 2006), durch Verapamil berichtet (Loe et al. 2000), doch ist diese gebunden an hohe Verapamil-Konzentrationen. Der vorliegende Rhodamin-Assay zeigt aber auch bei 3,125 µM Verapamil noch eine mittlere Inhibitionsrate von 55%.

Der spezifischere Inhibitor PSC833 wurde eingesetzt, um die erhaltenen Ergebnisse abzusichern. PSC833 wird von zahlreichen Arbeitsgruppen als spezifischer P-gp-Inhibitor anerkannt und für funktionelle Untersuchungen des P-Glycoproteins verwendet (Smit et al. 1999; Pavek et al. 2003; Haritova et al. 2007; Schrickx & Fink-Gremmels 2007; Zaja et al. 2008).

Desweiteren berichten Collett et al. (2004) von einer Induktion der *MDR1* mRNA und der P-gp-Expression durch Verapamil. In ihrer Studie werden zwar deutliche Effekte erst nach drei bis sechs Stunden erreicht, doch wurden in der vorliegenden Arbeit zum einen andere Zellen verwendet. Zum anderen wurden diese während des gesamten Versuchsablaufs über mehr als drei Stunden mit Verapamil inkubiert. Eine von Collett et al. (2004) detektierte Induktion von P-gp liegt daher auch hier im Bereich des Möglichen. Das bedeutet, dass die Inkubation mit Verapamil den P-gp getriebenen Rhodamin-Efflux unter Umständen noch erhöht. Auf diese Weise würde der Flux mittels P-gp im Vergleich zu einem möglichen MRP-getriebenen Efflux noch stärker überwiegen.

Eine Interpretation der Ergebnisse kann sich aufgrund fehlender Untersuchungen im Rind nur auf die erwähnten Studien beziehen. Ob tierartlich unterschiedliche Substratspezifitäten das Rind betreffen, bleibt offen.

Berücksichtigt man die geringere Rhodamin-Transportrate durch MRP1, die erzielten Inhibitionen durch beide Modulatoren, die eventuelle Induktion von P-gp sowie die RT-PCR-Ergebnisse, erscheint eine Beteiligung des bovinen MRP1 am Rhodamin-Transport von untergeordneter Bedeutung. Der Beweis könnte beispielsweise durch Einsatz spezifischer MRP1-Inhibitoren wie MK-571 (van Brussel et al. 2004; Stehfest et al. 2006; Haritova et al. 2007; Zaja et al. 2008) und -Substrate wie 5,6-carboxy-2'-7'-dichlorofluorescein (CDF) (Lehmann et al. 2001; Stehfest et al. 2006) erbracht werden.

Über BCRP, dessen mRNA ebenfalls in BCEC-1 nachweisbar ist, weiß man, dass eine Mutation der DNA in bestimmten Zelllinien für eine veränderte Substratspezifität sorgt (Honjo et al. 2001; Chen et al. 2003). Mutationen wurden durch Selektion der Zellen unter Einsatz von BCRP-Substraten erhalten. Die von Honjo et al. (2001) beschriebene Mutation ist für die Fähigkeit des veränderten Proteins, Rhodamin123 transportieren zu können verantwortlich. Für Wild-Typ BCRP hingegen stellt Rhodamin123 kein Substrat dar. Da die vorliegende Arbeit nicht auf der Nutzung einer derart selektierten Zelllinie beruht, ist hier eine Mutation, wie sie in der Arbeitsgruppe von Honjo durch gezielte Selektion erreicht wurde, nicht zu erwarten.

Anhand der genannten Zusammenhänge lässt sich schlussfolgern, dass eine Beteiligung von MRP1 und BCRP am Rhodamin-Efflux unwahrscheinlich ist. Ein hauptsächlich P-gp getriebener Flux des Fluoreszenzfarbstoffes kann vermutet werden. Seine funktionelle Aktivität in BCEC-1 ist offenbar.

4.3 Transport von radioaktiv markiertem Digoxin

Aufgrund der vorangegangenen Untersuchungen, ist davon auszugehen, dass P-Glycoprotein in BCEC-1 als funktionell aktive Efflux-Pumpe in der apikalen Zellmembran vorkommt.

Der Einsatz radioaktiv-markierter Substrate wie Digoxin im Transwell-System bietet eine weitere Möglichkeit, die Funktionalität und gleichzeitig die Lokalisation im

Zellmodell zu prüfen. Dieses System wird experimentell oft verwendet (Horio et al. 1989; Ueda et al. 1992; Tsuruoka et al. 1999; Ushigome et al. 2000; Balimane et al. 2004; Booth-Genthe et al. 2006; De Rosa et al. 2008). Das für Untersuchungen häufig eingesetzte Digoxin wird gemeinhin als P-gp-Substrat anerkannt (Schinkel et al. 1995; Ambudkar et al. 1999; Tsuruoka et al. 1999; Ushigome et al. 2000; Balimane et al. 2004; Fromm 2004; Choudhuri & Klaassen 2006).

Zunächst wurde die Dichtigkeit der Zellschicht mikroskopisch und mittels TEER-Messung (transepithelial electrical resistance) geprüft. Die TEER-Messung bedient sich des Widerstandes in Ω als Maß für den lückenlosen Verbund einer Zellschicht. Hohe TEER-Werte weisen eine positive Korrelation mit der Quantität junktionaler (interzellulärer) Komplexe auf (Bowen et al. 1996). Auch für BCEC-1 wurde gezeigt, dass mit zunehmender Konfluenz der Zellen die TEER-Werte steigen (Bridger et al. 2007). Gleichzeitig wurden in konfluenten BCEC-1-Kulturen verschiedene junktionale Komplexe nachgewiesen. In diesen vorangegangenen Arbeiten wurden 200 Ω als Mindestmaß für eine effektive physiologische Barriere angenommen und Kulturen mit einem mikroskopischen Bewuchs von lediglich 95% als konfluent betrachtet. Da für den Radioaktiv-Assay in der vorliegende Arbeit eine Konfluenz von 100% erforderlich war, fanden hier Inserts mit nur 200 Ω keine Verwendung. Es wurde davon ausgegangen, dass je höher der Widerstand ist, desto dichter die Kultur. Im Transport-Assay fanden deshalb nur Zellen Anwendung, die einen Widerstand von deutlich mehr als 500 Ω provozierten.

Die Ergebnisse des Digoxin-Transportes offenbaren eine Präferenz für den von basal nach apikal (b-a) gerichteten Flux, unabhängig von der eingesetzten Konzentration. Die Verwendung von Verapamil als Inhibitor bewirkte eine Angleichung des Fluxes beider Richtungen. Gleichzeitig erreichte der Flux unter Verapamil-Inkubation ein höheres Niveau.

Die Flux-Richtung des lipophilen P-gp-Substrates Digoxin unterstreicht die starke apikale Orientierung von P-Glycoprotein in BCEC-1. Der Flux von apikal nach basal (a-b) wird vermindert durch den direkten P-gp-vermittelten Flux zurück nach apikal. Dringt Digoxin hingegen von basal her ein, wird es weiter nach apikal transportiert. Auf diese Weise entsteht das Bild des stärkeren b-a-Fluxes.

Die Nivellierung beider Fluxes bei Einsatz von Verapamil spricht für eine Inhibition des P-gp. Durch Blockade des nach apikal gerichteten Digoxin-Transportes gelangt weniger Substrat von basal her in das obere Kompartiment. Wird Digoxin apikal

appliziert, dringt dieses in die BCEC-1 Zelle ein, gelangt aber wegen der Blockierung nicht mehr in üblichem Umfang per P-gp nach apikal zurück. Auf diese Weise ist der stärkere Flux von apikal nach basal (a-b) unter Verapamil-Einfluss erklärbar (Cavet et al. 1996).

Eine grundsätzlich stärkere Digoxin-Transportrate von basal nach apikal (b-a) deckt sich mit Beobachtungen anderer Gruppen in weiteren Zelllinien (Schinkel et al. 1995; Tsuruoka et al. 1999; Ushigome et al. 2000; Balimane et al. 2004).

Die inhibierende Wirkung von Verapamil auf den Digoxin-Transport ohne eine Niveau-Erhöhung ist bereits dokumentiert. So erreichen bei Balimane et al. (2004) die eingesetzten Konzentrationen von Cyclosporin und GF120918 zwar eine stärkere Inhibition, doch bleibt bei Verapamil und Quinidin ebenfalls eine Blockierung beobachtbar.

Ein Ansatz, das höhere Transport-Niveau bei Verwendung von Verapamil zu erklären, lässt sich auf die induzierende Wirkung dieses kompetitiven Inhibitors auf P-gp zurückführen. Collett et al. (2004) beschreiben die Wirkung von Verapamil auf die Expression von P-Glycoprotein (s. 4.2.). Dabei stellen sie fest, dass Verapamil sowohl P-gp mRNA-Spiegel als auch die Proteinexpression nach einiger Zeit erhöhen. Eine solche Induktion könnte auch im vorliegenden Fall eine Rolle spielen. Eine quantitative (Real-Time) PCR und Western Blotting nach Verapamil-Inkubation unterschiedlicher Länge können hier Aufschluss bringen.

4.4 BCEC-1 als in vitro Modell für plazentaren Transport

Mit der vorgelegten Arbeit wird die Existenz und Funktionalität von P-Glycoprotein in BCEC-1 nachgewiesen. Die Zelllinie kann, unter Verwendung der beiden hier durchgeführten Protokolle, für die Ermittlung der Funktionalität des P-gp Proteins in der bovinen Plazenta dienen.

In der Humanmedizin bedient man sich bei der Erforschung des plazentaren Transportes häufig verschiedener Choriocarcinoma-Zelllinien (Atkinson et al. 2003). Das Expressionsmuster von ABC-Transportern in verschiedenen Zelllinien und Plazentagewebe wies mittels quantitativer real-time PCR teils deutliche Unterschiede zwischen Zelllinien und Gewebe auf (Evseenko et al. 2006). MDR1 war deutlich stärker im Gewebe vertreten, wohingegen dort im Vergleich zu den Zelllinien weniger

BCRP nachweisbar war. Entsprechend dieser Beobachtungen fiel das Proteinexpressionsmuster aus. Dadurch wird deutlich, welche Einschränkungen Studien in ihrer Aussagekraft haben, wenn sie sich solcher Zelllinien für funktionelle Untersuchungen zum plazentaren Transport bedienen.

Im Gegensatz zu den Choriocarcinoma-Zellen hat BCEC-1 nicht nur Organspezifität, sondern repräsentiert zusätzlich einen Funktionszustand der Plazenta. BCEC-1 hat ihren Ursprung in Plazentomen trächtiger Rinder (Bridger et al. 2007). Die Zellen, aus denen die Linie generiert wurde, sind tatsächlich an den Vorgängen der Gestation beteiligt. Damit hat BCEC-1 gegenüber anderen Zelllinien, die aus dem nicht-trächtigen Endometrium gewonnen werden, einen entscheidenden Vorteil. Welche Unterschiede es zwischen trächtigen und nicht-trächtigen Tieren in Hinblick auf ihr Expressionsmuster gibt, belegt beispielsweise die Studie von Hansen et al. (1997). Hier wird die mRNA-Expression des boUCRP (Bovine ubiquitin cross-reactive protein) in zyklischen und tragenden Tieren verglichen. Im Gegensatz zu im Zyklus befindlichen Tieren (Tag 15 – 19), weisen trächtige Kühe zwischen Tag 15 und 21 der Gestation detektierbare Mengen boUCRP mRNA auf. Daraus schloss man, dass die Transkription des Gens vorübergehend während der frühen Trächtigkeit stattfindet und durch Interferon-Tau reguliert wird.

Nicht nur die Wahl zwischen trächtigen und nicht-trächtigen Tieren als Quelle, sondern ebenso die Wahl zwischen karunkulärer und interkarunkulärer Herkunft ist von Bedeutung. Asselin et al. (1998) wiesen unterschiedliche Reaktionen endometrialer Zellen aus Karunkel-Anlage und interkarunkulärer Region auf Oxytocin und Interferon-Tau nach. Dies lässt darauf schließen, dass es deutliche Funktionsunterschiede beider Zellarten gibt. Da das Plazentom, nicht jedoch die interkarunkulären Gebiete, für die hämotrophe Versorgung des Fetus verantwortlich ist, liegt die Nutzung einer karunkulären Zelllinie für die Ermittlung von Stoffübertragungen nahe. Es wird deutlich, dass eine Charakterisierung der gewonnen Zellen, wie sie von Bridger et al. für BCEC-1 vorgenommen wurde, vor ihrer weiteren Nutzung unerlässlich ist. Die Deckung der Verhältnisse in BCEC-1 mit denen in vivo zeigte sich nicht nur in den typischen Epithelzellmarkern Cytokeratin, Zonula-occludens-1 (Bridger et al. 2007), sondern auch in der Integrin-Expression. Ergebnisse bezüglich des Integrin-Rezeptors $\alpha_6\beta_1$ und des Laminins stimmen in vivo und in Primärkultur boviner Karunkel-Epithel-Zellen - nach hier dargestelltem Protokoll gewonnen - überein (Pfarrer et al. 2003; Zeiler et al. 2007). Beide Proteine

sind wichtig für Adhäsion und Signaltransduktion. Weiterhin konnte eine Übereinstimmung für Integrin-assoziierte Signalmoleküle zwischen Gewebe und Primärkultur aufgezeigt werden (Bridger et al. 2008). Zumindest für die 2007 von Bridger et al. untersuchten Marker konnte im Laufe der Passagierung und Kryokonservierung kein Unterschied festgestellt werden. Das deutet daraufhin, dass BCEC-1 als Repräsentant für das maternale Epithel der bovinen Plazenta angesehen werden kann. Diese Übereinstimmung und damit die Validität des Systems wird weiterhin durch die parallele mRNA-Expression der ABC-Transporter MRP1, BCRP und MDR1 in Zelllinie und Gewebe bestätigt.

Eine Einschränkung erhält das Modell BCEC-1 durch seine Gewinnung aus Tieren, die im vierten Monat tragend waren. Daher sind differenzierte Aussagen über Expression und Funktionalität zu Beginn oder Ende der Trächtigkeit für das Modell nicht möglich. Für andere Spezies sind Variationen der P-gp-Expression während der Trächtigkeit beschrieben (Kalabis et al. 2005; Ceckova-Novotna et al. 2006; Sun et al. 2006), so dass auch beim Rind Veränderungen in Betracht gezogen werden müssen. Derartige Modifikationen könnten die Anfälligkeit des Fetus gegenüber toxischen Schädigungen beeinflussen. Daraus würde eine restriktive Anwendung von Arzneimitteln zu bestimmten Trächtigkeitsstadien resultieren. Hierbei ist stets das Zusammenspiel zwischen fetaler und maternaler Expression und Funktion des Proteins zu berücksichtigen. Ideal wäre die Ergänzung durch eine fetale Trophoblast/Chorionepithel-Zelllinie, mit Hilfe derer man die Fähigkeit des fetalen Kompartiments prüft, die von der maternalen Seite abgegebenen Substanzen aufzunehmen. In einem weiteren Schritt könnte eine Kombination aus fetalem und maternalem Monolayer für die Ermittlung der Interaktion hilfreich sein.

Abschließend lässt sich festhalten, dass BCEC-1 ein Teilstück bei der Ermittlung des bovinen plazentaren Transportes darstellt. Zweifellos ist BCEC-1 ein geeignetes Modell, um den grundsätzlichen Transport buiatrischer, trächtigkeits-relevanter Stoffe zu untersuchen. Tierartlich verschiedene Substratspezifitäten haben die Schwierigkeit der Übertragung von Daten auf andere Spezies verdeutlicht (Schrickx & Fink-Gremmels 2008). BCEC-1 kann als Modell herangezogen werden um Substrate des bovinen P-gp zu identifizieren und die Beeinflussbarkeit des Transportes zu ermitteln. Die Vermutung liegt nahe, dass sich weitere Transportproteine wie BCRP oder MRP1 ebenfalls in diesem Zellmodell untersuchen

lassen. Inwieweit die Expression des jeweiligen Proteins den in vivo Verhältnissen entspricht, ist im Einzelfall zu untersuchen.

5 Zusammenfassung

Dem ABC-Transporter P-Glycoprotein (P-gp), dem Protein des *mdr1*-Gens, werden in Mensch, Ratte und Maus fetus-protective Aufgaben zugesprochen. Er dient einer großen Reihe an sehr unterschiedlichen Substraten als Transportsystem. Darunter befinden sich auch zahlreiche veterinärmedizinische Arzneimittel. Seine Rolle in einer Zelllinie boviner Karunkel-Epithel-Zellen (BCEC-1) sollte in dieser Arbeit im Hinblick auf eine Nutzung als in vitro Modell für plazentaren Transport geprüft werden.

RT-PCR-Analysen bewiesen das Vorkommen der mRNA nicht nur dieses Proteins, sondern auch zweier weiterer ABC-Transporter (BCRP und MRP1) in BCEC-1. Zudem konnten alle drei Vertreter in Karunkel- und Kotyledonen-Gewebe nachgewiesen werden.

Mit Hilfe immunhistochemischer Untersuchungen wurde P-gp der apikalen Zellmembran, das heißt der materno-fetalen Kontaktfläche zugeordnet.

Die funktionelle Aktivität des Proteins in der Zelllinie konnte mittels FACS-Analyse visualisiert werden. Hierzu wurde der Efflux des P-gp-Substrates Rhodamin123 mit und ohne Einsatz von P-gp-Inhibitoren Verapamil und PSC833 untersucht. Verschiedene Verapamil-Konzentrationen (200 µM, 50 µM, 12,5 µM, 3,125 µM, 0,78 µM) erzeugten zum Teil unterschiedlich starke Inhibitionen. So wurden im Mittel mit 3,125 µM Verapamil nur noch 55% der Zellen blockiert. Alle höheren Konzentrationen führten eine nahezu vollständige Inhibition herbei, ebenso wie 8 µM PSC833. Eine Dosis von 0,78 µM Verapamil hingegen konnte den Efflux nicht stoppen.

Ein Transport-Assay mit dem radioaktiv-markierten P-gp-Substrat Digoxin im Transwell-System diente einem weiteren Nachweis der Funktionalität des Proteins. Die Zellen wurden auf semipermeablen Membranen kultiviert. Die Konfluenz der Zellschicht wurde mittels TEER-Messung (transepithelial electrical resistance) überprüft. Zellen mit TEER-Werten über 500 Ω wurden zum Versuch zugelassen und entweder von apikal oder von basal mit markiertem Substrat (10 nM, 100 nM, 1 µM, 10 µM) beladen. Probenentnahmen aus dem gegenüberliegenden Kompartiment zu verschiedenen Zeitpunkten (5, 30, 60 und 90 Minuten) detektierten einen stärkeren Substrat-Flux von basal nach apikal. Der Einsatz von Verapamil (250 µM) für die

Inhibition des Digoxin-Fluxes (100 nM) zeigte eine Nivellierung beider Fluxrichtungen auf erhöhtem Fluxniveau. Der stärkere Flux von basal nach apikal wird auf den Efflux durch das apikal lokalisierte P-Glycoprotein zurückgeführt. Für eine erfolgreiche Inhibition des P-gp vermittelten Digoxin-Fluxes durch Verapamil spricht die Angleichung der Stärke beider Fluxrichtungen. Die Niveauerhöhung wurde auf eine in der Literatur berichtete Induktion von P-gp unter Verapamil-Einfluss zurückgeführt.

Die nachweislich karunkuläre Herkunft der bovinen Zelllinie bietet im Vergleich zu anderen Zellmodellen, wie den in der Humanmedizin genutzten Choriocarcinoma-Zelllinien oder den endometrialen Zellen nicht-trächtiger Rinder, den Vorteil der Organ- und Funktionsspezifität. Gleichzeitig repräsentiert BCEC-1 aber vor allen Dingen maternale Zellen des vierten Trächtigkeitsmonats. Rückschlüsse auf andere Trächtigkeitszeitpunkte sind nicht ohne Weiteres möglich. Desweiteren ist, mit Blick auf die fetus-protektive Funktion des P-gp, stets das fetale Kompartiment zu berücksichtigen. BCEC-1 stellt ein Teilstück der im Ablauf des plazentaren Transportes involvierten Anteile dar.

BCEC-1 kann als bovines Zellmodell für die Ermittlung von buiatrisch genutzten, Transporter-spezifischen Substraten und deren Beförderung im maternalen Karunkelepithel herangezogen werden.

6 Summary

The ABC-Transporter P-Glycoprotein (P-gp), the *mdr1*-Gen product, is supposed to protect the fetus in humans, rats and mice. It serves as transporter for many divergent substrates, veterinary products among them. In this study, its existence and functional role within the Bovine Caruncular Epithelial Cell Line (BCEC-1) were determined regarding its use as in vitro model for placental transport.

The mRNA of P-gp, BCRP and MRP1 could be detected in BCEC-1 and placentomal tissue using reverse transcriptase PCR.

Immunohistochemical analysis revealed a mainly apical localisation of P-gp in the cellular membrane of BCEC-1.

Functional activity of the protein was determined by FACS-analysis using P-gp substrate Rhodamine123. The efflux of this fluorescent substance was analysed in presence and absence of the two P-gp inhibitors Verapamil and PSC833. Application of several concentrations of Verapamil (200 μ M, 50 μ M, 12,5 μ M, 3,125 μ M, 0,78 μ M) provoked inhibitions partly differing in strenght. 3,125 μ M Verapamil could only block 55% of the rhodamine efflux, whereas higher concentrations and PSC833 (8 μ M) revealed almost total inhibition. Dosages of 0,78 μ M Verapamil did not stop the efflux at all.

Radioactive labelled Digoxin, another P-gp substrate, was used to perform a transpotion assay in a transwell-system. BCEC-1 was cultured on semipermeable membranes until reaching confluence, which was confirmed by TEER-measurements (transepithelial electrical resistance). Monolayers producing resistance of more than 500 Ω were admitted to the experiment. The substrate (10 nM, 100 nM, 1 μ M, 10 μ M) was applied either to the apical or basal side. At several timepoints (5, 30, 60, 90 minutes) samples were taken from the opposed compartment. As a result a stronger basal to apical flux was observed. Application of Verapamil (250 μ M) for the inhibition of the Digoxin (100nM) transportation detected a levelling of the two fluxes on a basically higher flux level. The stronger flux from basal to apical was attributed to the efflux by the apically located P-gp. The levelling of both fluxes was credited to the successful inhibition of P-gp by Verapamil. The concurrent higher level of digoxin flux might be attributed to a reported induction of P-gp by Verapamil.

The proven caruncular origin of this bovine cell line offers some advantages. In contrast to human choriocarcinoma cells or endometrial cells derived from non-pregnant cows, BCEC-1 is specific for the organ and the functional state of the placenta. It represents maternal cells involved in gestation of the fourth month which restricts conclusions to that timepoint. Besides, for propositions about the fetus-protective function of P-gp one should take the fetal compartment into account. BCEC-1 represents a part of the transporting systems in the placenta.

BCEC-1 can serve as bovine in vitro model for the investigation of buiatric, transporter specific substrates and their transportation across the maternal caruncular epithelium.

7 Literaturverzeichnis

Allikmets R., Schriml L.M., Hutchinson A., et al. (1998) A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. *Cancer Res* **58**, 5337-5339

Ambudkar S.V., Dey S., Hrycyna C.A., et al. (1999) Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **39**, 361-398

Andaluz A., Tusell J., Trasserres O., et al. (2003) Transplacental transfer of propofol in pregnant ewes. *The Veterinary Journal* **166**, 198-204

Asselin E., Drolet P., Fortier M.A. (1998) In vitro response to oxytocin and interferon-tau in bovine endometrial cells from caruncular and inter-caruncular areas. *Biol Reprod* **59**, 241-247

Atkinson D.E., Greenwood S.L., Sibley C.P., et al. (2003) Role of MDR1 and MRP1 in trophoblast cells, elucidated using retroviral gene transfer. *Am J Physiol Cell Physiol* **285**, C584-591

Balimane P.V., Patel K., Marino A., et al. (2004) Utility of 96 well Caco-2 cell system for increased throughput of P-gp screening in drug discovery. *Eur J Pharm Biopharm* **58**, 99-105

Becher P., Orlich M., Thiel H.-J. (2001) RNA recombination between persisting pestivirus and a vaccine strain: Generation of cytopathogenic virus and induction of lethal disease. *J. Virol.* **75**, 6256-6264

Björkman N. (1954) Morphological and histochemical studies on the bovine placenta. *Acta Anat (Basel)* **22 Suppl. 22**, 1-91

Björkman N. & Bloom G. (1957) On the fine structure of the foetal-maternal junction in the bovine placentome. *Cell and Tissue Research* **45**, 649-659

Björkman N. & Sollen P. (1960) Morphology of the bovine placenta at normal delivery. *Acta Vet Scand* **1**, 347-362

Boesch D., Muller K., Pourtier-Manzanedo A., et al. (1991) Restoration of daunomycin retention in multidrug-resistant P388 cells by submicromolar concentrations of SDZ PSC 833, a nonimmunosuppressive cyclosporin derivative. *Experimental Cell Research* **196**, 26-32

Booth-Genthe C.L., Louie S.W., Carlini E.J., et al. (2006) Development and characterization of LLC-PK1 cells containing Sprague-Dawley rat Abcb1a (Mdr1a): comparison of rat P-glycoprotein transport to human and mouse. *J Pharmacol Toxicol Methods* **54**, 78-89

Borst P. (1999) Multidrug resistance: a solvable problem? *Ann Oncol* **10 Suppl 4**, 162-4

Borst P. & Elferink R.O. (2002) Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem* **71**, 537-92

Bowen J.A., Newton G.R., Weise D.W., et al. (1996) Characterization of a polarized porcine uterine epithelial model system. *Biol Reprod* **55**, 613-619

Bridger P.S., Haupt S., Klisch K., et al. (2007) Validation of primary epitheloid cell cultures isolated from bovine placental caruncles and cotyledons. *Theriogenology* **68**, 592-603

Bridger P.S., Haupt S., Leiser R., et al. (2008) Integrin activation in bovine placentomes and in caruncular epithelial cells isolated from pregnant cows. *Biol Reprod* **79**, 274-282

Bridger P.S., Menge C., Leiser R., et al. (2007) Bovine Caruncular Epithelial Cell Line (BCEC-1) isolated from the placenta forms a functional epithelial barrier in a polarised cell culture model. *Placenta* **28**, 1110-7

Buse P., Woo P.L., Alexander D.B., et al. (1995) Glucocorticoid-induced functional polarity of growth factor responsiveness regulates tight junction dynamics in transformed mammary epithelial tumor cells. *J. Biol. Chem.* **270**, 28223-28227

Capece B.P.S., Pérez R., Andaluz A., et al. (2002) Placental transfer of albendazole sulfoxide enantiomers in sheep. *The Veterinary Journal* **163**, 155-160

Carney E.W., Scialli A.R., Watson R.E., et al. (2004) Mechanisms regulating toxicant disposition to the embryo during early pregnancy: An interspecies comparison. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews* **72**, 345-360

Cavet M., West M., Simmons N. (1996) Transport and epithelial secretion of the cardiac glycoside, digoxin, by human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Br J Pharmacol.* **118**, 1389-96

Ceckova-Novotna M., Pavek P., Staud F. (2006) P-glycoprotein in the placenta: expression, localization, regulation and function. *Reprod Toxicol* **22**, 400-10

Chaudhary P.M. & Roninson I.B. (1991) Expression and activity of P-glycoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cells. *Cell* **66**, 85-94

Chen Z.-S., Robey R.W., Belinsky M.G., et al. (2003) Transport of methotrexate, methotrexate polyglutamates, and 17 β -estradiol 17- β -D-glucuronide by ABCG2: Effects of acquired mutations at R482 on methotrexate transport. *Cancer Res* **63**, 4048-4054

Choudhuri S. & Klaassen C.D. (2006) Structure, function, expression, genomic organization, and single nucleotide polymorphisms of human ABCB1 (MDR1), ABCC (MRP), and ABCG2 (BCRP) efflux transporters. *Int J Toxicol* **25**, 231-59

Clark F.S., Parkinson T., Hitchcock C.A., et al. (1996) Correlation between rhodamine 123 accumulation and azole sensitivity in candida species: possible role for drug efflux in drug resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**, 419-425

Classen-Linke I., Kusche M., Knauthe R., et al. (1996) Establishment of a human endometrial cell culture system and characterization of its polarized hormone responsive epithelial cells. *Cell and Tissue Research* **287**, 171-185

Cole S.P.C. & Deeley R.G. (1998) Multidrug resistance mediated by the ATP-binding cassette transporter protein MRP. *BioEssays* **20**, 931-940

Collett A., Tanianis-Hughes J., Warhurst G. (2004) Rapid induction of P-glycoprotein expression by high permeability compounds in colonic cells in vitro: a possible source of transporter mediated drug interactions? *Biochemical Pharmacology* **68**, 783-790

Constable P.A., Lawrenson J.G., Dolman D.E., et al. (2006) P-Glycoprotein expression in human retinal pigment epithelium cell lines. *Exp Eye Res* **83**, 24-30

Cordon-Cardo C., O'Brien J.P., Boccia J., et al. (1990) Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues. *J Histochem Cytochem* **38**, 1277-87

Cordon-Cardo C., O'Brien J.P., Casals D., et al. (1989) Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 695-8

Cox D.S., Scott K.R., Gao H., et al. (2001) Influence of multidrug resistance (MDR) proteins at the blood-brain barrier on the transport and brain distribution of enaminone anticonvulsants. *J Pharm Sci* **90**, 1540-52

Dantzer V. & Leiser R. (2006) Placentation. In: *Textbook of veterinary histology*. Dellmann, H.D. and Eurell, J.A. Baltimore: Blackwell Publishing, 279-297

Dantzig A.H., de Alwis D.P., Burgess M. (2003) Considerations in the design and development of transport inhibitors as adjuncts to drug therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* **55**, 133-150

Dantzig A.H., Shepard R.L., Cao J., et al. (1996) Reversal of P-Glycoprotein-mediated multidrug resistance by a potent cyclopropyldibenzosuberane modulator, LY335979. *Cancer Res* **56**, 4171-4179

De Rosa M.F., Ackerley C., Wang B., et al. (2008) Inhibition of multidrug resistance by adamantylgb3, a globotriaosylceramide analog. *J Biol Chem* **283**, 4501-11

Dean M., Rzhetsky A., Allikmets R. (2001) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res.* **11**, 1156-1166

Doyle L.A., Yang W., Abruzzo L.V., et al. (1998) A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 15665-15670

Evseenko D.A., Paxton J.W., Keelan J.A. (2006) ABC drug transporter expression and functional activity in trophoblast-like cell lines and differentiating primary trophoblast. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **290**, R1357-1365

- Fisher G.A., Lum B.L., Hausdorff J., et al. (1996)** Pharmacological considerations in the modulation of multidrug resistance. *European Journal of Cancer* **32**, 1082-1088
- Fortier M.A., Guilbault L.A., Grasso F. (1988)** Specific properties of epithelial and stromal cells from the endometrium of cows. *J Reprod Fertil* **83**, 239-248
- Fresno L., Andaluz A., Moll X., et al. (2008)** Placental transfer of etomidate in pregnant ewes after an intravenous bolus dose and continuous infusion. *The Veterinary Journal* **175**, 395-402
- Frey H.H. & Löscher W. (2002)** Passage über biologische Grenzflächen. In: *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin*. Stuttgart: Enke Verlag, 16-19
- Fromm M.F. (2004)** Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers. *Trends Pharmacol Sci* **25**, 423-9
- Gaillard P.J., van der Sandt I.C., Voorwinden L.H., et al. (2000)** Astrocytes increase the functional expression of P-glycoprotein in an in vitro model of the blood-brain barrier. *Pharm Res* **17**, 1198-205
- Galabova-Kovacs G., Walter I., Aurich C., et al. (2004)** Steroid receptors in canine endometrial cells can be regulated by estrogen and progesterone under in vitro conditions. *Theriogenology* **61**, 963-976
- Germann U.A., Ford P.J., Shlyakhter D., et al. (1997)** Chemosensitization and drug accumulation effects of VX-710, verapamil, cyclosporin A, MS-209 and GF120918 in multidrug resistant HL60/ADR cells expressing the multidrug resistance-associated protein MRP. [Article]. *Anti-Cancer Drugs* **8**, 141-155
- Geyer J., Döring B., Godoy J.R., et al. (2005)** Frequency of the nt230 (del4) MDR1 mutation in Collies and related dog breeds in Germany. *Journal of Veterinary Pharmacology & Therapeutics* **28**, 545-551
- Gottesman M.M., Fojo T., Bates S.E. (2002)** Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* **2**, 48-58
- Gross T.S., Williams W.F., Russek-Cohen E. (1991)** Cellular changes in the peripartum bovine fetal placenta related to placental separation. *Placenta* **12**, 27-35
- Grosser O. (1909)** Die Placentation. In: *Vergleichende Anatomie und Entwicklungsgeschichte der Eihäute und der Placenta mit besonderer Berücksichtigung des Menschen*. Wien, Leipzig: Wilhelm Braumüller, 89-289
- Grosser O. (1927)** Vergleichende Placentationslehre. In: *Frühentwicklung Eihautbildung und Placentation des Menschen und der Säugetiere*. München: Verlag von J.F. Bergmann, 95-174
- Hamada H. & Tsuruo T. (1988)** Purification of the 170- to 180-kilodalton membrane glycoprotein associated with multidrug resistance. 170- to 180-kilodalton membrane glycoprotein is an ATPase. *J. Biol. Chem.* **263**, 1454-1458

Hansen T.R., Austin K.J., Johnson G.A. (1997) Transient ubiquitin cross-reactive protein gene expression in the bovine endometrium. *Endocrinology* **138**, 5079-5082

Haritova A.M., Schrickx J.A., Fink-Gremmels J. (2007) Functional studies on the activity of efflux transporters in an ex vivo model with chicken splenocytes and evaluation of selected fluoroquinolones in this model. *Biochem Pharmacol* **73**, 752-9

Hediger M.A., Romero M.F., Peng J.B., et al. (2004) The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteinsIntroduction. *Pflugers Arch* **447**, 465-8

Hegewisch-Becker S., Staib F., Loning T., et al. (1998) No evidence of significant activity of the multidrug resistance gene product in primary human breast cancer. *Ann Oncol* **9**, 85-93

Helm F., Kretzschmar R., Leuschner F., et al. (1976) Investigations on the effect of the combination sulfamoxole/trimethoprim on fertility and fetal development in rats and rabbits (author's trans.). *Arzneimittelforschung* **26**, 643-51

Higgins C.F. (1992) ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* **8**, 67-113

Hoffmann B. & Schuler G. (2002) The bovine placenta; a source and target of steroid hormones: observations during the second half of gestation. *Domest Anim Endocrinol* **23**, 309-20

Honjo Y., Hrycyna C.A., Yan Q.-W., et al. (2001) Acquired mutations in the MXR/BCRP/ABCP gene alter substrate specificity in MXR/BCRP/ABCP-overexpressing cells. *Cancer Res* **61**, 6635-6639

Horio M., Chin K.V., Currier S.J., et al. (1989) Transepithelial transport of drugs by the multidrug transporter in cultured Madin-Darby canine kidney cell epithelia. *J Biol Chem* **264**, 14880-4

Horio M., Gottesman M.M., Pastan I. (1988) ATP-dependent transport of vinblastine in vesicles from human multidrug-resistant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**, 3580-3584

Jauniaux E., Jurkovic D., Lees C., et al. (1996) In-vivo study of diazepam transfer across the first trimester human placenta. *Hum. Reprod.* **11**, 889-892

Johnson G., Austin K., Collins A., et al. (1999) Endometrial ISG17 mRNA and a related mRNA are induced by interferon-tau and localized to glandular epithelial and stromal cells from pregnant cows. *Endocrine* **10**, 243-252

Johnson G.A., Burghardt R.C., Newton G.R., et al. (1999) Development and characterization of immortalized ovine endometrial cell lines. *Biol Reprod* **61**, 1324-1330

Johnson L.V., Walsh M.L., Chen L.B. (1980) Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **77**, 990-994

Jonker J.W., Merino G., Musters S., et al. (2005) The breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2) concentrates drugs and carcinogenic xenotoxins into milk. *Nat Med* **11**, 127-129

Jonker J.W., Smit J.W., Brinkhuis R.F., et al. (2000) Role of breast cancer resistance protein in the bioavailability and fetal penetration of topotecan. *J Natl Cancer Inst* **92**, 1651-6

Kalabis G.M., Kostaki A., Andrews M.H., et al. (2005) Multidrug resistance phosphoglycoprotein (ABCB1) in the mouse placenta: Fetal protection. *Biol Reprod* **73**, 591-597

Keeler R.F. & Panter K.E. (1989) Piperidine alkaloid composition and relation to crooked calf disease-inducing potential of *Lupinus formosus*. *Teratology* **40**, 423-432

Klisch K., Pfarrer C., Schuler G., et al. (1999) Tripolar acytokinetic mitosis and formation of feto-maternal syncytia in the bovine placentome: different modes of the generation of multinuclear cells. *Anat Embryol (Berl)* **200**, 229-37

Kolwankar D., Glover D.D., Ware J.A., et al. (2005) Expression and function of ABCB1 and ABCG2 in human placental tissue *Drug Metab Dispos* **33**, 524-529

König J., Nies A.T., Cui Y., et al. (1999) Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1461**, 377-394

Krishnamurthy P. & Schuetz J.D. (2006) Role of ABCG2/BCRP in biology and medicine. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **46**, 381-410

Lackner T., Muller A., Pankraz A., et al. (2004) Temporal modulation of an autoprotease is crucial for replication and pathogenicity of an RNA virus. *J. Virol.* **78**, 10765-10775

Lankas G.R., Cartwright M.E., Umbenhauer D. (1997) P-glycoprotein deficiency in a subpopulation of CF-1 mice enhances avermectin-induced neurotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* **143**, 357-65

Lankas G.R., Wise L.D., Cartwright M.E., et al. (1998) Placental P-glycoprotein deficiency enhances susceptibility to chemically induced birth defects in mice. *Reprod Toxicol* **12**, 457-63

Laven R.A. & Peters A.R. (1996) Bovine retained placenta: aetiology, pathogenesis and economic loss. *Vet Rec.* **139**, 465-471

Leazer T.M. & Klaassen C.D. (2003) The presence of xenobiotic transporters in rat placenta. *Drug Metab Dispos* **31**, 153-167

- Lee Y.-M., Tscherne D.M., Yun S.-I., et al. (2005)** Dual mechanisms of pestiviral superinfection exclusion at entry and RNA replication. *J. Virol.* **79**, 3231-3242
- Lehmann T., Köhler C., Weidauer E., et al. (2001)** Expression of MRP1 and related transporters in human lung cells in culture. *Toxicology* **167**, 59-72
- Leiser R. (1975)** Kontaktaufnahme zwischen Trophoblast und Uterusepithel während der frühen Implantation beim Rind. *Anatomia, Histologia, Embryologia* **4**, 63-86
- Leiser R. & Kaufmann P. (1994)** Placental structure: in a comparative aspect. *Exp Clin Endocrinol* **102**, 122-34
- Leiser R., Krebs C., Klisch K., et al. (1997)** Fetal villosity and microvasculature of the bovine placentome in the second half of gestation. *J Anat* **191 (Pt 4)**, 517-27
- Leiser R., Pfarrer C., Abd-Elnaeim M., et al. (1998)** Feto-maternal anchorage in epitheliochorial and endotheliochorial placental types studied by histology and microvascular corrosion casts. *Trophoblast Research* **12**, 21-39
- Leslie E.M., Deeley R.G., Cole S.P.C. (2005)** Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicology and Applied Pharmacology* **204**, 216-237
- Littleford J. (2004)** Effects on the fetus and newborn of maternal analgesia and anesthesia: A review. *Can J Anesth* **51**, 586-609
- Liu X.D. & Liu G.Q. (2001)** P glycoprotein regulated transport of glutamate at blood brain barrier. *Acta Pharmacol Sin* **22**, 111-6
- Liu Y., Li G.P., Sessions B.R., et al. (2008)** Nicotine induces multinuclear formation and causes aberrant embryonic development in bovine. *Molecular Reproduction and Development* **75**, 801-809
- Loe D.W., Deeley R.G., Cole S.P.C. (2000)** Verapamil stimulates glutathione transport by the 190-kDa Multidrug Resistance Protein 1 (MRP1). *J Pharmacol Exp Ther* **293**, 530-538
- Loehr B.I., Frey H.R., Moennig V., et al. (1998)** Experimental induction of mucosal disease: consequences of superinfection of persistently infected cattle with different strains of cytopathogenic bovine viral diarrhea virus. *Archives of Virology* **143**, 667-679
- Lorke D.E., Kruger M., Buchert R., et al. (2001)** In vitro and in vivo tracer characteristics of an established multidrug-resistant human colon cancer cell line. *J Nucl Med* **42**, 646-54
- Loyacano A.F., Williams J.C., Gurie J., et al. (2002)** Effect of gastrointestinal nematode and liver fluke infections on weight gain and reproductive performance of beef heifers. *Vet Parasitol.* **107**, 227-34

Maliepaard M., Scheffer G.L., Faneyte I.F., et al. (2001) Subcellular localization and distribution of the Breast Cancer Resistance Protein transporter in normal human tissues. *Cancer Res* **61**, 3458-3464

Mao Q. & Unadkat J.D. (2005) Role of the breast cancer resistance protein (ABCG2) in drug transport. *Aaps J* **7**, E118-33

Mealey K.L.a., Bentjen S.A.a., Gay J.M.a., et al. (2001) Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the *mdr1* gene. [Article]. *Pharmacogenetics* **11**, 727-33

Minderman H., O'Loughlin K.L., Pendyala L., et al. (2004) VX-710 (Biricodar) increases drug retention and enhances chemosensitivity in resistant cells overexpressing P-Glycoprotein, Multidrug Resistance Protein, and Breast Cancer Resistance Protein. *Clin Cancer Res* **10**, 1826-1834

Minderman H., Vanhoefer U., Toth K., et al. (1996) DiOC2(3) is not a substrate for multidrug resistance protein (MRP)-mediated drug efflux. *Cytometry* **25**, 14-20

Miyake K., Mickley L., Litman T., et al. (1999) Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: Demonstration of homology to ABC transport genes. *Cancer Res* **59**, 8-13

Mossman H.W. (1987) Types of eutherian placentation. In: *Vertebrate fetal membranes*. Basingstoke, UK: The Macmillan Press LTD, 91-97

Munson L., Chandler S.K., Schlafer D.H. (1988) Cultivation of bovine fetal and adult endometrial epithelial cells. *Methods in Cell Science* **11**, 129-133

Nagashige M., Ushigome F., Koyabu N., et al. (2003) Basal membrane localization of MRP1 in human placental trophoblast. *Placenta* **24**, 951-958

Neyfakh A.A. (1988) Use of fluorescent dyes as molecular probes for the study of multidrug resistance. *Experimental Cell Research* **174**, 168-176

Neyfakh A.A., Serpinskaya A.S., Chervonsky A.V., et al. (1989) Multidrug-resistance phenotype of a subpopulation of T-lymphocytes without drug selection. *Experimental Cell Research* **185**, 496-505

Nobili S., Landini I., Giglioni B., et al. (2006) Pharmacological strategies for overcoming multidrug resistance. *Current Drug Targets* **7**, 861-879

Özvegy C., Litman T., Szakács G., et al. (2001) Functional characterization of the human multidrug transporter, ABCG2, expressed in insect cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **285**, 111-117

Pavek P., Staud F., Fendrich Z., et al. (2003) Examination of the functional activity of P-glycoprotein in the rat placental barrier using rhodamine 123. *J Pharmacol Exp Ther* **305**, 1239-1250

Pelissier C.L. (1972) Herd breeding problems and their consequences. *J. Dairy Sci.* **55**, 385-391

Perez-Tomas R. (2006) Multidrug resistance: Retrospect and prospects in anti-cancer drug treatment. *Current Medicinal Chemistry* **13**, 1859-1876

Pfarrer C., Ebert B., Miglino M.A., et al. (2001) The three-dimensional feto-maternal vascular interrelationship during early bovine placental development: a scanning electron microscopical study. *J Anat* **198**, 591-602

Pfarrer C., Hirsch P., Guillomot M., et al. (2003) Interaction of integrin receptors with extracellular matrix is involved in trophoblast giant cell migration in bovine placentomes. *Placenta* **24**, 588-97

Plumb D.C. (1995) Veterinary Drug Handbook. White Bear Lake, USA: PharmaVet Publishing,

Purvis H.T., Whittier J.C., Boyles S.L., et al. (1994) Weight gain and reproductive performance of spring-born beef heifer calves intraruminally administered oxfendazole. *J. Anim Sci.* **72**, 817-823

Raderer M. & Scheithauer W. (1993) Clinical trials of agents that reverse multidrug resistance. A literature review. *Cancer* **72**, 3553-3563

Reimers T.J., Ullmann M.B., Hansel W. (1985) Progesterone and prostanoid production by bovine binucleate trophoblastic cells. *Biol Reprod* **33**, 1227-1236

Rocchi E., Khodjakov A., Volk E.L., et al. (2000) The product of the ABC half-transporter gene ABCG2 (BCRP/MXR/ABCP) is expressed in the plasma membrane. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **271**, 42-46

Rose J.M., Peckham S.L., Scism J.L., et al. (1998) Evaluation of the role of P-glycoprotein in ivermectin uptake by primary cultures of bovine brain microvessel endothelial cells. *Neurochem Res* **23**, 203-9

Roulet A., Puel O., Gesta S., et al. (2003) MDR1-deficient genotype in Collie dogs hypersensitive to the P-glycoprotein substrate ivermectin. *European Journal of Pharmacology* **460**, 85-91

Schinkel A.H., Smit J.J.M., van Tellingen O., et al. (1994) Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell* **77**, 491-502

Schinkel A.H., Wagenaar E., van Deemter L., et al. (1995) Absence of the *mdr1a* P-Glycoprotein in mice affects tissue distribution and pharmacokinetics of dexamethasone, digoxin, and cyclosporin A. *J Clin Invest.* **96**, 1698-705

Schleis S.E., LeBlanc A.K., Neilsen N.R., et al. (2008) Flow cytometric evaluation of multidrug resistance proteins on grossly normal canine nodal lymphocyte membranes. *American Journal of Veterinary Research* **69**, 1310-1315

Schneider E. & Hunke S. (1998) ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: Functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains. *FEMS Microbiology Reviews* **22**, 1-20

Schricks J. & Fink-Gremmels J. (2007) P-glycoprotein-mediated transport of oxytetracycline in the Caco-2 cell model. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **30**, 25-31

Schricks J.A. & Fink-Gremmels J. (2008) Implications of ABC transporters on the disposition of typical veterinary medicinal products. *European Journal of Pharmacology* **585**, 510-519

Schuler G., Wirth C., Klisch K., et al. (2000) Characterization of proliferative activity in bovine placentomes between day 150 and parturition by quantitative immunohistochemical detection of Ki67-antigen. *Reproduction in Domestic Animals* **35**, 157-162

Shemesh M., Hansel W., Strauss J.F.d. (1984) Modulation of bovine placental prostaglandin synthesis by an endogenous inhibitor. *Endocrinology* **115**, 1401-1405

Shemesh M., Harel-Markowitz E., Gurevich M., et al. (1994) Staurosporine stimulates progesterone production by bovine placental cells. *Biol Reprod* **51**, 146-151

Smit J.W., Huisman M.T., van Tellingen O., et al. (1999) Absence or pharmacological blocking of placental P-glycoprotein profoundly increases fetal drug exposure. *J Clin Invest* **104**, 1441-7

Soule H.D., Maloney T.M., Wolman S.R., et al. (1990) Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. *Cancer Res* **50**, 6075-6086

St-Pierre M.V., Serrano M.A., Macias R.I., et al. (2000) Expression of members of the multidrug resistance protein family in human term placenta. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **279**, R1495-503

Starling J.J., Shepard R.L., Cao J., et al. (1997) Pharmacological characterization of LY335979: A potent cyclopropyldibenzosuberane modulator of P-glycoprotein. *Advances in Enzyme Regulation* **37**, 335-347

Stehfest E., Torky A., Glahn F., et al. (2006) Non-destructive micromethod for MRP1 functional assay in human lung tumor cells. *Archives of Toxicology* **80**, 125-133

Strahl H. (1906) Die Embryonalhüllen der Säugetiere und die Placenta. In: *Hertwigs Handbuch der Vergleichenden und Experimentellen Entwicklungslehre der Wirbeltiere*. Hertwig. Jena: Fischer, 235-3683

Sun M., Kingdom J., Baczyk D., et al. (2006) Expression of the multidrug resistance P-Glycoprotein, (ABCB1 glycoprotein) in the human placenta decreases with advancing gestation. *Placenta* **27**, 602-609

Szachowicz-Petelska B., Figaszewski Z., Lewandowski W. (2001) Mechanisms of transport across cell membranes of complexes contained in antitumour drugs. *International Journal of Pharmaceutics* **222**, 169-182

Taguchi Y., Saeki K., Komano T. (2002) Functional analysis of MRP1 cloned from bovine. *FEBS Letters* **521**, 211-213

Takahashi T., Aso H., Hashizume K. (2001) Immunological and biological activities of bovine placental lactogen in placental explant culture. *The Journal of Reproduction and Development* **47**, 63-67

Thiebaut F., Tsuruo T., Hamada H., et al. (1987) Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**, 7735-7738

Thiel H.J., Plagemann P.G.W., Moennig V. (1996) Pestiviruses. In: *Fields Virology*. Fields B.N., Knipe D.M. and Howley P.M., Philadelphia: Lippincott Raven Publishers, 1059-1073

Toffoli G., Simone F., Corona G., et al. (1995) Structure-activity relationship of verapamil analogs and reversal of multidrug resistance. *Biochemical Pharmacology* **50**, 1245-1255

Tsuruoka S., Sugimoto K.I., Ueda K., et al. (1999) Removal of digoxin and doxorubicin by multidrug resistance protein-overexpressed cell culture in hollow fiber. *Kidney Int* **56**, 154-63

Ueda K., Okamura N., Hirai M., et al. (1992) Human P-glycoprotein transports cortisol, aldosterone, and dexamethasone, but not progesterone. *J. Biol. Chem.* **267**, 24248-24252

Ueda K., Taguchi Y., Morishima M. (1997) How does P-glycoprotein recognize its substrates? *Semin Cancer Biol* **8**, 151-9

Ushigome F., Takanaga H., Matsuo H., et al. (2000) Human placental transport of vinblastine, vincristine, digoxin and progesterone: contribution of P-glycoprotein. *Eur J Pharmacol* **408**, 1-10

Utoguchi N., Chandorkar G.A., Avery M., et al. (2000) Functional expression of P-glycoprotein in primary cultures of human cytotrophoblasts and BeWo cells. *Reprod Toxicol* **14**, 217-24

van Brussel J.P., Oomen M.A., Vossebeld P.J.M., et al. (2004) Identification of multidrug resistance-associated protein 1 and glutathione as multidrug resistance mechanisms in human prostate cancer cells: chemosensitization with leukotriene D4 antagonists and buthionine sulfoximine. *BJU International* **93**, 1333-1338

Wakabayashi Y., Chua J., Larkin J.M., et al. (2007) Four-dimensional imaging of filter-grown polarized epithelial cells. *Histochem Cell Biol* **127**, 463-72

Watanabe T., Tsuge H., Oh-Hara T., et al. (1995) Comparative study on reversal efficacy of SDZ PSC 833, cyclosporin a and verapamil on multidrug resistance in vitro and in vivo. *Acta Oncologica* **34**, 235 - 241

Williams W.F., Margolis M.J., Manspeaker J., et al. (1987) Peripartum changes in the bovine placenta related to fetal membrane retention. *Theriogenology* **28**, 213-223

Wimsatt W.A. (1951) Observations on the morphogenesis, cytochemistry, and significance of the binucleate giant cells of the placenta of ruminants. *American Journal of Anatomy* **89**, 233-281

Wooding F.B. (1982) Structure and function of placental binucleate ('giant') cells. *Bibl Anat* 134-9

Wooding F.B. (1992) Current topic: the synepitheliochorial placenta of ruminants: binucleate cell fusions and hormone production. *Placenta* **13**, 101-13

Wooding F.B. & Flint D.J. (1994) Development of embryonic membranes in the various vertebrate taxa. In: *Marshall's Physiology of Reproduction*. Lammin, G. E. London, Glasgow, New York, Tokyo, Melbourne, Madras: Chapman & Hall, 233-460

Wooding F.B., Staples L.D., Peacock M.A. (1982) Structure of trophoblast papillae on the sheep conceptus at implantation. *J Anat* **134**, 507-16

Wooding F.B.P. (1992) The synepitheliochorial placenta of ruminants: Binucleate cell fusions and hormone production. *Placenta* **13**, 101-113

Xiao C.W. & Goff A.K. (1998) Differential effects of oestradiol and progesterone on proliferation and morphology of cultured bovine uterine epithelial and stromal cells. *J Reprod Fertil* **112**, 315-324

Zaja R., Caminada D., Loncar J., et al. (2008) Development and characterization of P-glycoprotein 1 (Pgp1, ABCB1)-mediated doxorubicin-resistant PLHC-1 hepatoma fish cell line. *Toxicol Appl Pharmacol* **227**, 207-18

Zeiler M., Leiser R., Johnson G.A., et al. (2007) Development of an in vitro model for bovine placentation: A comparison of the in vivo and in vitro expression of integrins and components of extracellular matrix in bovine placental cells. *Cells Tissues Organs* **186**, 229-242

Zoli A.P., Demez P., Beckers J.F., et al. (1992) Light and electron microscopic immunolocalization of bovine pregnancy- associated glycoprotein in the bovine placentome. *Biol Reprod* **46**, 623-629

8 Anhang

8.1 Lösungen und Puffer

Zellkultur

Kryolösung

DMSO 100%	100 µl
FCS	300 µl
Medium	600 µl

Trypsin 2x (0,5%)

PEM	8 ml
Trypsin 10x (2,5%)	2 ml

EDTA 0,5 M

NaOH-Plätzchen	8 g
EDTA	74,4 g
mit Aqua dest. auf 400 ml auffüllen	
pH-Wert auf 8,0 einstellen	

EDTA 200 mM

EDTA 0,5 M	40 ml
Aqua dest.	60 ml

PEM

Zellkultur-Wasser	45 ml
PBS 10x (PAA)	5 ml
EDTA (200 mM)	500 µl

PCR

TAE 50x

Tris	242 g
Aqua dest.	500 ml
0,5 M Na ₂ EDTA (pH 8,0)	100 ml
Eisessig	57,1 ml
mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen	

TAE 1x

TAE 50x	20 ml
Aqua dest.	980 ml

TE-Puffer

1 M Tris (pH 8,0)	10 ml
0,5 M Na ₂ EDTA (pH 8,0)	2 ml
Aqua dest.	800 ml
mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen	

Tris 10x (1 M)

Tris	121,14 g
Aqua dest.	800 ml
mit konzentrierter HCl auf pH 8,0 einstellen	
mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen	

Tris 1x (0,1 M)

Tris 10x	100 ml
Aqua dest.	900 ml

Immunfluoreszenz

Höchst 33342-Stammlösung (5 mg/ ml)

Höchst 5 mg

Aqua dest. 1 ml

Höchst 33342-Gebrauchslösung

Höchst-Stammlösung 1 µl

PBS 1x 4,99 ml

PBS 1x (0,01 M)

PBS 1 Tablette

Aqua dest. 200 ml

PFA (10%)

Paraformaldehyd 10 g

Aqua dest. 90 ml

Unter Rühren auf 60°C erhitzen

Mit NaOH (1 M) auf pH 7,4 einstellen

PFA (2%)

PFA 10% 7 ml

PBS 1x 28 ml

Succrose 250 mg

Digitonin 0,005%

Digitonin 0,005 g

PBS 1x 100 ml

PBS/BSA-Lösung

BSA 10 g

PBS 1x 1000 ml

Donkeyserum 10%

Donkeyserum	800 µl
PBS/BSA-Lösung	7200 µl

Rhodamin-Assay

PBS 1x (0,01 M)

PBS	1 Tablette
Aqua dest.	200 ml

Rhodamin-Stammlösung (20 mM)

Rhodamin	3,81 mg
Ethanol 100%	500 µl

Transport-Assay

Stocklösung Hepes 100 mM

Hepes	23,831 g
Aqua dest.	1000 ml

Stocklösung KCl 200 mM

KCl	14,91 g
Aqua dest.	1000 ml

Stocklösung $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 100 mM

$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	24,648 g
Aqua dest.	1000 ml

Stocklösung CaCl_2 200 mM

CaCl_2	22,198 g
Aqua dest.	1000 ml

Stocklösung KH_2PO_4 200 mM

KH_2PO_4	27,218 g
Aqua dest.	1000 ml

0,1 M KCl

KCl	7,45 mg
Aqua dest.	1000 ml

8.2 Material

Geräte

Dampfsterilisator, Varioklav	H+P, Oberschleimheim
EasyPhor- Horizontale Gelelektrophorese	Biozym, Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
EVOM™ Epithelial Voltohmmeter	WPI Inc., Berlin
FACS Calibur	Becton Dickinson Labware, Heidelberg
Gefrierschrank	Robert Bosch GmbH, Gerlingen-Schillerhöhe
Gefrierschrank	Heraeus Instruments, Hanau
Inkubator Heraeus 6000	Heraeus Instruments
Invers-Mikroskop, Durchlicht	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Kühl-Gefrierkombination	Robert Bosch GmbH
Lichtmikroskop Leica DM LB	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Messplattform	Zentralwerkstatt Organische Chemie JLU Giessen
Mikrotom Microm	Microm GmbH, Type HM 400 R, D-Walldorf
Mikrowelle	Daewoo Electronics Europe GmbH, Butzbach
Milli_DL aqua dest Anlage	Millipore GmbH, Eschborn
Nalgene™ Cryo 1°C Freezing Container	Nalgene/ Fisher Scientific GmbH, Schwerte
pH-Meter CG840	Schott Instruments GmbH, Mainz
Photomikroskop Axiophot	Carl Zeiss AG
Pinzetteb	Ratiolab GmbH, Dreieich
Pipetboy comfort	Integra Biosciences AG, Chur, CH
Pipettboy acu	Integra bioscience
Pipetten (100-1000µl, 10-100µl, 1-10µl, 0,1-10µl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe; Socorex/ Fisher Scientific GmbH, Schwerte; Eppendorf AG, Hamburg
Rotationsschüttler, polymax 1040	Heidolph Instruments GmbH&Co. KG, Schwabach
Sicherheitswerkbank	Fischer Scientific GmbH, Schwerte
Spectrophotometer SmartSpec 3000	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Sterilbank	Fisher Scientific, Schwerte
Sterilisator	Heraeus Instruments
Thermocycler, Mastercycler gradient	Eppendorf AG
Thermomixer 5437	Eppendorf AG
Thermoshaker TS-100	G.Kisker GbR, Steinfurt
UV-Lichtquelle	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
UV-Lichtquelle GelDoc 2000	Bio-Rad Laboratories GmbH

Vortex-Gerät
Waage AT 261 Delta Range
Waage PB 3002-S
Wallac 1409 Liquid Scintillation Counter
Wasserbad
Zählkammer nach Neubauer
Zentrifuge (Labofuge GL)
Zentrifuge 5415D
Zentrifuge, Rotanta

Heidolph Instruments GmbH&Co. KG
Mettler-Toledo GmbH, Giessen
Mettler-Toledo GmbH
Wallac/ PerkinElmer Inc., Waltham, USA
Memmert GmbH& Co. KG, Schwabach
Carl Roth GmbH & Co. KG
Heraeus Instruments GmbH
Eppendorf AG
Hettich-Zentrifugen GmbH + Co. KG, Tuttlingen

Verbrauchsmaterialien

Cell Scratcher
Cryogenic vials 1,2ml
Deckgläser

Eppendorf Reaktionsgefäße (0,5 ml; 1,5ml; 2,0ml)
FACS-Röhrchen
Feuchte Kammer
Filter Millex, 0,22µM
Glasküvetten, Färbekästen nach Hellendahl
Kryohalterung
Kryoschutz
Kulturflaschen mit Vent Schraubkappen (25cm²; 75cm²)
Kulturschale Ø 6cm
Minivials
Multiwellplates 6, 12, 24, 96 well

Nobaglove-Latex- Handschuhe

PAP PEN, Immunostaining Pen extra dick
Pasteurpipetten
PCR Softtubes 0,2ml
Pipettenspitzen
PP-Test tubes (15ml; 50ml)
QIAshredder
Sekuroka-Entsorgungsbeutel aus Polyethylen
Serologische Pipetten 1, 2, 5, 10, 25ml, Polystyrene

TPP AG, Trasadingen, CH
Corning GmbH, Kaiserslautern
Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH&Co. KG, Braunschweig
MAGV GmbH

Becton Dickinson Labware
DakoCytomation GmbH, Hamburg
Millipore GmbH
MAGV GmbH

Carl Roth GmbH & Co. KG
Nalgene/Fischer Scientific GmbH
TPP AG

TPP AG
Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
TPP AG;
Corning GmbH .
Noba Verbandmittel Danz GmbH & Co. KG, Wetter/Ruhr
G. Kisker GbR

Brand GmbH, Wertheim
Biozym, Oldendorf
Sarstedt AG & Co.
Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Qiagen GmbH, Hilden
Carl Roth GmbH & Co. KG

Sarstedt Ag & Co.

Skalpelle (Größe 20, 22)
 sterile Einmalspritzen 50ml
 SuperFrost Ultra Plus Objektträger
 Transwell Permeable Supports, 0,4µm
 Polyester Membrane, 12mm Insert

pfm - Produkte für die Medizin AG,
 Köln
 Dispomed Witt oHG, Gelnhausen
 Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk
 GmbH&Co. KG
 Corning GmbH

Chemikalien

Agarose Neeo, Ultra-Qualität
 Albumin Fraktion V
 β-Mercaptoethanol

 CaCl₂
 Cholinchlorid
 Digitonin (Digitin)
³[H]-Digoxin
 Digoxin (12β-Hydroxydigitoxin)
 Dimethylsulfoxid (DMSO)
 Dithiothreitol (DTT) 0,1M
 dNTP Mix
 Ethanol absolut

 Ethanol 70% (V/V)
 Ethidium Bromid
 Ethylenediamine Tetraacetic Acid
 (EDTA)
 FACS Clean
 FACS Flow™
 FACS Rinse
 5x First-Strand Buffer (250 mM Tris-
 HCl (pH 8.3)
 Gene Ruler™ 100bp DNA Ladder
 Glucose
 Hepes
 Hoechst 33342 (Bisbenzimid)
 Isopropanol (Isopropylalkohol)
 Kaliumchlorid (KCl)
 Kaliumhydrogenphosphat (KH₂PO₄)
 Kalilauge (KOH)
 Loading Dye Solution 6x
 Magnesiumsulfat (MgSO₄·7H₂O)
 Methanol (MetOH)
 Natriumchlorid (NaCl)

Carl Roth GmbH & Co. KG
 Carl Roth GmbH & Co. KG
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
 München
 Carl Roth GmbH & Co. KG
 Carl Roth GmbH & Co. KG
 Fluka, Buchs, CH
 Perkin Elmer LAS GmbH
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH
 Carl Roth GmbH & Co. KG
 Invitrogen GmbH
 Eurogentec, Seraing, Belgium
 Otto Fischar GmbH & Co. KG,
 Saarbrücken
 Otto Fischar GmbH & Co. KG
 Sigma-Aldrich GmbH
 Sigma-Aldrich GmbH

 Becton Dickinson Labware
 Becton Dickinson Labware
 Becton Dickinson Labware
 Invitrogen GmbH, Karlsruhe

 Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
 Carl Roth GmbH & Co. KG
 Carl Roth GmbH & Co. KG
 Sigma-Aldrich GmbH
 Carl Roth GmbH & Co. KG
 Carl Roth GmbH & Co. KG
 Carl Roth GmbH & Co. KG
 Carl Roth GmbH & Co. KG
 Fermentas GmbH
 Carl Roth GmbH & Co. KG
 Riedel-de Häen, Seelze
 Carl Roth GmbH & Co. KG

Natriumzitat	Sigma-Aldrich GmbH
Normal Donkeyserum	Chemicon, Temecula, USA
Normal horse serum	Vector Laboratories, USA-Burglingame
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich GmbH
PBS Tabletten	Sigma-Aldrich GmbH
Primerpaare	MWG Biotech GmbH, Ebersberg
ProLong® Gold antifade reagent	Invitrogen GmbH
PSC 833 (SDZ 215-833)	Novartis Pharma GmbH, Nürnberg
Random Primers	Promega GmbH, Mannheim
Rhodamine 123 (2-(6-Amino-3imino-3H-xanthen-9-yl))	Sigma-Aldrich GmbH
RNase Inhibitor GeneAmp	Applied Biosystems Applera Deutschland GmbH, Darmstadt
Succrose	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
SuperScript™ III RT	Invitrogen GmbH
Taq DNA Polymerase (AccuPrime Taq DNA Polymerase System)	Invitrogen GmbH
Tris-HCL	Carl Roth GmbH & Co. KG
Triton X-100	Sigma-Aldrich GmbH
Trypanblau	Flow Laboratories, Irvine, Schottland
(±)-Verapamil hydrochloride	Sigma-Aldrich GmbH
Xylol	Carl Roth GmbH & Co. KG

Puffer/ Sera/ Medien/ Substrate für die Zellkultur

Cell Culture Water EP Grade	PAA Laboratories GmbH
Dimethylsulfoxid für die Zellkultur	Applichem GmbH, Darmstadt
DMEM/Ham's F12 without L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A
Dulbecco's PBS (10x)	PAA Laboratories GmbH
Fibronectin, 0,1% Solution, from Bovine Plasma	Sigma-Aldrich GmbH,
Foetal Bovine Serum, Standard Quality	PAA Laboratories GmbH
Hank's BSS (1x), with Ca&Mg, without Phenolred	PAA Laboratories GmbH
Hank's BSS (1x), without Ca&Mg, without Phenolred	PAA Laboratories GmbH
Insulin-Transferrin-Selenium-X	Gibco/ Invitrogen GmbH
L-Glutamine 200mM (100x)	PAA Laboratories GmbH
Penicillin/ Streptomycin (100x)	PAA Laboratories GmbH
Trypsin 10x, 2,5% in D-PBS	PAA Laboratories GmbH

Kommerzielle Assays und Tests

Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I

Qiaquick Gel Extraction Kit

RNase-Free DNase Kit

RNeasy Mini Kit

Taq PCR Kit

Becton Dickinson Labware,

Qiagen GmbH

Qiagen GmbH

Qiagen GmbH

New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M.

Antikörper

Alexa Fluor® 488 (rabbit anti-mouse IgG)

Alexa Fluor® 568 (goat anti-rabbit IgG)

Anti-P-Glycoprotein Mouse mAb (C219)

Anti-P-Glycoprotein Mouse mAb (C494)

Mouse monoclonal (JSB-1) to P Glycoprotein

Invitrogen GmbH

Invitrogen GmbH

Calbiochem,

Calbiochem, Darmstadt

Abcam, Cambridge, UK

Software

Adobe Photoshop

CellQuestPro, FACS-Analyse

FinchTV Version 1.4.0

GraphpadPrism 4

MegAlign

Primaclade

(<http://www.umsl.edu/services/kellogg/primaclade.html>)

Adobe Systems Inc., San Jose, USA

Becton Dickinson Labware

Geospiza Inc., Seattle, USA

Graphpad Software, Inc., La Jolla, USA

DNASTar Inc., Madison, USA

Kellogg Lab

8.3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Transportmechanismen durch die Zellmembran	14
Abb. 2:	Struktur eines typischen ABC-Transporters	15
Abb. 3:	Struktur eines Halbtransporters wie ABCG2	17
Abb. 4:	Struktur des MRP1	18
Abb. 5:	Darstellung eines Inserts.....	29
Abb. 6:	Darstellung des FACS-Prinzips.....	43
Abb. 7:	Strukturformel von Rhodamin123.....	44
Abb. 8:	BCEC-1 nach 60 min Behandlung mit 50 μ M Verapamil und 30 μ M Rhodamin.....	49
Abb. 9:	FACS-Analyse von BCEC-1 Zellen nach Rhodamin-Assay.	50
Abb. 10:	Versuchsaufbau der Transportmessung.	53
Abb. 11:	Nachweis spezifischer mRNA-Amplifikate von ABC-Transportern (MDR1, BCRP, MRP1) in BCEC-1 (1), manuell separiertem Karunkel- (2) und Kotyledonengewebe (3) mittels RT-PCR.....	57
Abb. 12:	Detektion von P-Glycoprotein (grün) in BCEC-1-Kulturen.....	59
Abb. 13:	FACS-Analyse von BCEC-1 Zellen nach Rhodamin-Assay.	61
Abb. 14:	Mittlere TEER-Werte verwendeter Passagen.....	62
Abb. 15:	Mittlere zeitabhängige Steigung des Digoxin-Fluxes.....	63
Abb. 16:	Mittlere zeitabhängige Steigung des Digoxin-Fluxes mit und ohne Einwirkung eines Inhibitors.....	65

8.4 Tabellenverzeichnis

Tab. 1. :	Beispiele für P-gp Substrate.....	21
Tab. 2. :	Pipettierschema 1 für die reverse Transkription	33
Tab. 3. :	Pipettierschema 2 für die reverse Transkription	33
Tab. 4. :	Primer, ihre Sequenzen, ihre Amplifikatgrößen und NCBI Accession Nummern	34
Tab. 5. :	β-Actin Primer, Sequenzen, Amplifikatgröße	35
Tab. 6. :	Pipettierschema für einen 50 µl PCR-Ansatz	35
Tab. 7. :	Für die Sequenzierung verwendete Primer, ihre Sequenzen, NCBI Accession Nummern.....	39
Tab. 8. :	Daten des Primärantikörpers.....	42
Tab. 9. :	Daten des Sekundärantikörpers.....	42
Tab. 10. :	Rhodamin (30 µM) - Verapamil Verdünnungen.....	45
Tab. 11. :	Verapamil - DMSO-Puffer	46
Tab. 12. :	Verapamil - Hanks'	46
Tab. 13. :	Trypsin (2x) - Verapamil.....	47
Tab. 14. :	PBS-Waschlösung mit Verapamil	47
Tab. 15. :	Transportpuffer: Substanzen für 250 ml	52
Tab. 16. :	Pipettierschema Digoxin kalt.....	52
Tab. 17. :	Pipettierschema für die Testflüssigkeit (markiertes Digoxin)	52
Tab. 18. :	Pipettierschema Verapamil-Vorinkubation	54
Tab. 19. :	Pipettierschema Digoxin-Testlösung.....	54
Tab. 20. :	Pipettierschema Digoxin-Verapamil-Testlösung.....	55
Tab. 21. :	Pipettierschema Verapamil-Transportpuffer.....	55
Tab. 22. :	Im Rhodamin-Assay erzielte Inhibition	60

8.5 Abstracts und Präsentationen

1. Characterization of substance transportation by bovine caruncular cell line 1 (BCEC-1)

Waterkotte, B., Döring, B., Hambruch, n., Baal, N., Artoni, L., Bridger, P., Geyer, J., Tinneberg, H.-R., Pfarrer, C.:

In: Rodriguez-Mártinez, H. (Hrsg.):

Reproduction in domestic animals 43 (1) DVG: 41. Jahrestagung Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung gleichzeitig 33. Veterinär-Humanmedizinische Gemeinschaftstagung, Gießen, 28.02.-29.02.2008; Berlin: Blackwell, 2008, S. 34-35

ISSN 0936-6768

2. Transepithelial transport in the bovine caruncular epithelial cell line-1 (BCEC-1) is mediated by the P-glycoprotein

Waterkotte, Berit; Döring, Barbara; Hambruch, Nina; Baal, Nelli; Artoni, Laura; Geyer, Joachim; Tinneberg, Hans-Rudolf; Pfarrer, Christiane

In: Magyar Állatorvosok Lapja (Hungarian Veterinary Journal)

XXVIIth EAVA Congress – Budapest, 2008; Vol. 130. Supplement III.,

S.36

HU ISSN 0025-004X

3. Bovine Caruncular Epithelial Cell Line (BCEC-1) Serves as In Vitro Model for Drug Transportation by Multidrug-Resistance Gene Product P-gp

B. Waterkotte, B. Döring, N. Hambruch, N. Baal, L. Artoni, J. Geyer, H.-R. Tinneberg, C. Pfarrer

In: Placenta

IFPA Meeting 2008/ 12th EPG Conference; Seggau Castle, Austria; 10.09.-13.09. 2008; Elsevier, August 2008, 29, S. A.67 (P12.08)

ISSN 0143-4004

4. Immunolocalization of tissue inhibitor of metalloproteinase 2 (TIMP-2) in placentomes from cloned and non cloned calves

Artoni, L.P., Hambruch, N., Waterkotte, B., Papa, P.C., Tinneberg, H.-R., Pfarrer, C.

In: Rodriguez-Mártinez, H. (Hrsg.):

Reproduction in domestic animals 43 (1) DVG: 41. Jahrestagung Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung gleichzeitig 33. Veterinär-Humanmedizinische Gemeinschaftstagung, Gießen, 28.-29.02.2008; Berlin: Blackwell, 2008, S. 3-4

ISSN 0936-6768

8.6 Danksagung

Frau Prof. Dr. Christiane Pfarrer danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas und für das Anvertrauen der Zelllinie. Auf ihre stets freundliche, engagierte Hilfestellung in allen Belangen konnte ich mich immer verlassen. Dafür gebührt ihr großer Dank!

Für die finanzielle Unterstützung während meiner Arbeit bedanke ich mich bei der H. Wilhelm Schaumann Stiftung.

Herrn Prof. Dr. Joachim Geyer möchte ich für die Kooperation bei der Erstellung dieser Arbeit und für immer neue Ideen danken. Für die Bereitstellung der entsprechenden Materialien und Räumlichkeiten danke ich ihm und auch Herrn Prof. Dr. Ernst Petzinger herzlich.

Bei unserer Arbeitsgruppe möchte ich mich für die freundschaftliche Atmosphäre bedanken. Besonderer Dank gilt unserer Biochemikerin Frau Dr. Nina Hambruch: Hätte es sie nicht gegeben, wäre das Laborleben mit all seinen Mysterien äußerst beschwerlich geworden. Ohne ihre Hilfe wäre vieles gar nicht möglich gewesen! Frau Laura Artoni danke ich für ihre Freundschaft und ihr kameradschaftliches Wesen.

Herrn Dr. Philip Bridger danke ich sehr, gerade für die anfängliche Hilfe im Umgang mit der Zelllinie, seine Informationsbereitschaft und für sein offenes Ohr in Laborbelangen.

Frau Barbara Döring aus der Arbeitsgruppe Geyer danke ich von ganzem Herzen für ihre ständige Bereitschaft, mich zu unterstützen und mir zu helfen, obwohl sie selber immer in eigener oder fremder Sache tätig war.

Frau Dr. Nelli Baal danke ich für ihre Einführung in die FACS-Analyse und ihre fortwährende Bereitschaft zu weiterer Hilfestellung.

Frau Dorina Zoltan und Frau Bettina Gill danke ich für ihren Einsatz in den täglichen Belangen.

Bei Frau Cornelia Hof möchte ich mich für ihre freundschaftliche Unterstützung im Forschungslabor bedanken.

Großer Dank gilt dem Team der Werkstatt der organischen Chemie der JLU: Der Entwurf und die Erstellung der Messplattform für den Transport-Assay durch Herrn Schardt waren keineswegs selbstverständlich.

Frau Dr. Martina Zeiler gilt mein Dank für ihr „Adlerauge“.

Prof. Dr. Dr. h.c. H.-R. Tinneberg danke ich für die Ermöglichung, meine Arbeit in seinem Hause fertigzustellen.

Für seine Hilfsbereitschaft und die Möglichkeit, in seinem Literaturfundus stöbern zu dürfen, danke ich Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Rudolf Leiser.

Prof. Dr. Martin Bergmann danke ich für die Probenbereitstellung und die Möglichkeit zur Nutzung von Mikrotom und Mikroskop.

Ein dickes Dankeschön auch an „meine Mädels“ inklusive Anhang: Freunde sind zum Durchhalten unerlässlich! Hättet ihr mich nicht in Eure Mitte aufgenommen, wäre mir eine Menge Spaß entgangen.

Ganz besonders danke ich Björn H. Bender. All die Tiefen aufzufangen und mich immer wieder aufzurichten war sicher nicht leicht. Danke, dass Du durchgehalten hast!

Mein Dank gilt auch meiner Familie, ohne deren Hilfe und Unterstützung das Studium und der Weg zur Doktorarbeit niemals möglich gewesen wären.

8.7 Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFBENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5539-4



9 17 8 3 8 3 5 119 5 5 3 9 4